



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS DE
RATÓN. CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Mariángela Meyer Villamandos**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Elizabeth Merentes Díaz.

CARACAS, VENEZUELA
Febrero, 2012

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO

**“ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS DE
RATÓN. CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*”**

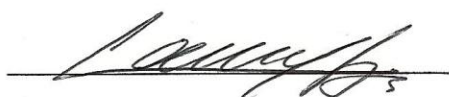
Presentado por la Br. **Mariángela Meyer Villamandos**, C.I. 18.358.552, ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Defendido públicamente el día 24 de Febrero de 2012 y **aprobado** por los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias, quienes consideraron que dicho trabajo cumplió con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos.



Prof. Elizabeth Merentes D.

TUTOR



Prof. Concepción Hernández C.

JURADO



Prof. Lisandro Romero P.

JURADO

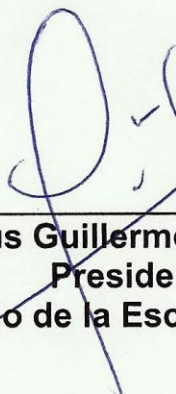


Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 14/03/2012, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Meyer V. Mariangela**; titular de la cédula de identidad No. 18.358.552; titulado: **“Establecimiento del Cultivo de Células Madre Mesenquimales de la Membrana Amniótica de Fetos de Ratón. Caracterización y Diferenciación *in Vitro*”**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veinte días del mes de marzo del año dos mil doce.


Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz
Presidente de
Consejo de la Escuela de Biología



JR/br.-

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo a las personas más importantes en mi vida, mi familia, en especial a mis padres, Edwín y María Antonia por todo el amor y apoyo que imprimen al cumplimiento de mis sueños...

AGRADECIMIENTOS

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

A mis padres, María Antonia y Edwin, quienes con su esfuerzo, amor, confianza y comprensión me han permitido siempre realizar mis sueños; sin su apoyo no podría haber llegado hasta donde estoy. A ustedes, quienes me lo han dado todo, mil gracias.

A mi hermana, Mariana Victoria, quien me ha dado siempre su amor y amistad cómplice. Por su honestidad, lealtad y fuerza de voluntad, que hacen que sea un ejemplo a seguir y por protegerme como una hermana mayor, a pesar de ser la menor.

A mi familia, por orgullecerse de mis éxitos como si fuesen propios, en especial a mi abuela Maruja, a mis tíos, Evelyn y Tiqui y a mis chachas, Daniela y Alejandra; por apoyarme incondicionalmente y enseñarme el valor del lazo familiar.

A mis abuelos, Felipe y Ángela y al Tío Ricardo, por protegerme, por abrirme los caminos, porque a pesar de que ya no estén entre nosotros, nunca he dejado de sentir su apoyo y aliento. Sé que están orgullosos de mí.

A mi tutora, la Dra. Elizabeth Merentes, quien más que una guía académica fue una mentora en múltiples vivencias. Por su dedicación, apoyo y comprensión. Por brindarme la oportunidad que me permite hoy optar al título de Licenciada al abrirme las puertas del laboratorio y las del mundo de la investigación. Gracias por tenerme paciencia, creer en mí y confiar en mis decisiones.

A la Dra. María Lorena Márquez, por su ayuda y cariño. Por apoyarme, reconfortarme y aconsejarme cuando lo necesité y cuando no, también.

A todas y cada una de las personas que me han acompañado en mi experiencia en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores; gracias por hacerme sentir en casa. A mis compañeros de

laboratorio por todo lo enseñado, no solo en el ámbito científico, sino también en el ámbito personal; a Emily, Lorena, Eliana, a la Sra. Dora, Valentina, a la Sra. Mery, Bélgica y a Felipe.

Al Dr. Gilberto Payares, a la Dra. Cristina Sanoja y a la Sra. Dora, quienes me han brindado una inestimable ayuda al abrirme las puertas del Bioterio del IBE y poner a mi total disposición las instalaciones y el material que me fuese necesario. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y por involucrarse y preocuparse por este proyecto.

A la Prof. Concepción Hernández y al Prof. Lisandro Romero, por su tiempo y dedicación en la revisión del trabajo quienes en su papel de evaluadores contribuyeron en que este llegase al nivel que tiene.

A Wolfgang Vivas, que con su cariño, comprensión y paciencia, me ha brindado todo su apoyo durante la realización de este proyecto y antes de él.

A mis amigos, quienes me han acompañado en los momentos más importantes de mi carrera y brindado su apoyo incondicional, en especial a Vanessa, Diomarina, Mónica, Nélida y Eduardo que siempre me han tenido fe logrando que confíe más en mí misma y en mis capacidades.

A la Facultad de Ciencias, porque me enseñó a pensar y sobre todo a la Escuela de Biología, la cual me brindó las herramientas y el adiestramiento necesario para hacer ciencia, forjando el profesional que soy ahora.

RESUMEN

En los últimos años, ha surgido un nuevo campo de la medicina y la biología que está íntimamente ligado al conocimiento y el desarrollo histológico, el cual se conoce con el nombre de bioingeniería de tejidos. Para conseguir su objetivo de regenerar, restablecer o simular la función normal de un tejido mediante la utilización de células que son cultivadas en el laboratorio, la ingeniería tisular necesita una fuente adecuada de estas que sean funcionales y viables, así como biomateriales y señales moleculares de distintas naturaleza.

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

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

La membrana amniótica representa la porción más interna de las membranas extraembrionarias y se compone de una sola capa de células epiteliales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Desde que sus células fueron descritas se ha estudiado su caracterización fenotípica, ontogénica y funcional; sin embargo, aún quedan numerosos aspectos por dilucidar sobre su biología, especialmente en lo relacionado con su funcionalidad ya que ésta puede variar en respuesta a señales presentes en nichos o microambientes particulares *in vitro*, dependiendo de la interacción directa con otras células o de la liberación de factores solubles y de crecimiento.

Los estudios realizados con este tipo de células troncales son escasos, e inexistentes en nuestro país, por lo que en el presente trabajo se expondrá el desarrollo de un proyecto de investigación sobre el aislamiento, establecimiento, caracterización y diferenciación *in vitro* de células provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Se evaluó si estas células mantienen su funcionalidad y viabilidad bajo ciertas condiciones de cultivo, expresan características propias fenotípicas y bioquímicas de células madre mesenquimales y pueden ser canalizadas hacia linajes de origen mesodérmico.

Los cultivos primarios en monocapa de las células aisladas de la membrana amniótica de fetos de ratón, obtenidos por explantes y disgregación enzimática con tripsina – colagenasa tipo V, mostraron una heterogeneidad caracterizada por dos tipos principales de fenotipos celulares: una población de células con morfología fusiforme y una con amplio volumen citoplasmático, considerándose la segunda como una subpoblación de la primera. Los subcultivos celulares permitieron la obtención de una población celular más homogénea, persistiendo mayoritariamente las células con morfología ahusada. La proliferación de cada cultivo fue diferencial, pero un ensayo para evaluar este parámetro determinó que los cultivos primarios y subcultivos posteriores mostraron el comportamiento típico de las células mantenidas *in vitro*, caracterizado por tres fases, con lo que se definió el comienzo de la fase de crecimiento exponencial, sin llegar a observarse una fase de senescencia o muerte.

Por medio de ensayos de caracterización morfológica e inmunocitoquímica, se pudo evidenciar la obtención de células con características de células troncales de naturaleza mesenquimal, las cuales presentaron expresión de Vimentina y Stro-1 e inexpressión de antígenos de histocompatibilidad H2.

Las células cultivadas en monocapa sometidas a ensayos de inducción, mostraron diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico lo cual se determinó mediante coloraciones histoquímicas con Rojo Alizarina S, Safranina O, Azul de Toluidina, Azul Alcian y Sudan III. Se observó la expresión de fenotipos celulares particulares y la deposición de componentes de matriz extracelular, intensificándose esto a medida que se inducía por más tiempo. Estos resultados indican la importancia del contacto célula – célula, célula – matriz y la acción de factores solubles específicos para el mantenimiento de las células, estimulación de su proliferación y biosíntesis de matriz.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición, clasificación y potencialidad de las células madre.....	1
1.2. Células madre mesenquimales.....	4
1.3. Microambiente celular y factores que influyen sobre el comportamiento de las células.....	7
1.4. Diferenciación de las células madre mesenquimales hacia linajes de origen mesodérmico.....	11
1.5. Membrana Amniótica: Características histológicas, funcionales e inmunológicas.....	14
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Material biológico.....	28
5.2. Estudio histológico de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	28
5.3. Obtención y establecimiento del cultivo primario de las células del estroma de la membrana amniótica.....	28
5.3.1. Cultivo por explantes.....	29
5.3.2. Disgregación enzimática.....	30
5.4. Establecimiento de subcultivos.....	31
5.5. Evaluación de eficiencia de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (UFC-F).....	32
5.6. Ensayos de proliferación.....	32
5.6.1. Curva de crecimiento.....	33
5.6.2. Método del MTT.....	34

5.7. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	35
5.7.1. Observaciones periódicas al microscopio.....	36
5.7.2. Coloración histológica de rutina May Grünwald-Giemsa.....	36
5.7.3. Determinación inmunocitoquímica contra Vimentina, Stro-1 y H2.....	37
5.8. Ensayos de inducción a la diferenciación en cultivos en monocapa.....	39
5.9. Evaluación histoquímica de la diferenciación celular.....	40
6. RESULTADOS.....	42
6.1. Estudio histológico de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	42
6.2. Establecimiento de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	43
6.3. Amplificación de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	46
6.4. Determinación de la proliferación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	48
6.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	50
6.6. Evaluación morfológica e histoquímica de la inducción de la diferenciación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	54
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
7.1. Establecimiento de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	63
7.2. Amplificación de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	66

7.3. Determinación de la proliferación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	68
7.4. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	71
7.5. Análisis de la diferenciación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	75
8. CONCLUSIONES.....	84
9. RECOMENDACIONES.....	86
10. BIBLIOGRAFÍA.....	87
11. APÉNDICES.....	109
11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular.....	109
11.1.1. Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio.....	109
11.1.2. Medio nutritivo.....	109
11.1.3. Solución de Tripsina al 0,25%.....	109
11.1.4. Solución de Colagenasa tipo V al 0,1%.....	110
11.1.5. Solución de Gelatina al 1%.....	110
11.1.6. Solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02%.....	110
11.1.7. Soluciones STOCK de los Factores Solubles Ensayados.....	110
11.1.7.1. Ácido Ascórbico 1M.....	110
11.1.7.2. β -Glicerolfosfato 1M.....	110
11.1.7.3. Isobutilmetilxantina 10mM.....	111
11.1.7.4. Indometacina 10mM.....	111
11.1.8. Medios Inductores Ensayados.....	111
11.1.8.1. Medio Osteogénico.....	111

11.1.8.2. Medio Condrogénico.....	111
11.1.8.3. Medio Adipogénico.....	111
11.2. Soluciones fijadoras.....	112
11.2.1. Solución de Formalina neutral al 10%.....	112
11.2.2. Solución de Albúmina de Mayer.....	112
11.3. Soluciones colorantes.....	112
11.3.1. Solución de Rojo de Alizarina S al 2%.....	112
11.3.2. Solución acuosa de Safranina O al 0,1%.....	112
11.3.3. Solución de Fast Green al 0,001%.....	112
11.3.4. Solución de Azul de Toluidina al 0,1%.....	112
11.3.5. Solución de Azul Alcian pH 2,5.....	113
11.3.6. Solución de Sudan III al 0,2%.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencialidad.....	3
Figura 2. Diferenciación de células madre mesenquimales en múltiples linajes mesodérmicos.....	5
Figura 3. Ontogenia de las células madre mesenquimales.....	7
Figura 4. Representación esquemática de las etapas de desarrollo del amnios de ratón.....	16
Figura 5. Representación esquemática de un feto de ratón y sus membranas extraembrionarias, a los 9 días y medio después de la implantación.....	17
Figura 6. Esquema representativo de un corte longitudinal de amnios y corion.....	18
Figura 7. Corte longitudinal de la membrana amniótica de fetos de ratón tratada con la técnica de coloración hematoxilina/eosina.....	42
Figura 8. Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, aisladas a partir de explantes.....	43
Figura 9. Poblaciones celulares obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	45
Figura 10. Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	46
Figura 11. Subcultivos en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	47
Figura 12. Comparación del patrón de crecimiento de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, en medio de cultivo DMEM suplementado con diferentes concentraciones de SFB.....	48
Figura 13. UFC-F de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	50
Figura 14. Coloración May Grünwald-Giemsa de cultivos primarios y subcultivos en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de ratón.....	51
Figura 15. Evaluación inmunocitoquímica de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	53

Figura 16. Cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón a los 8 días de inducción.....	55
Figura 17. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación osteogénica en monocapa con Rojo Alizarina S de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	56
Figura 18. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Safranina O de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	57
Figura 19. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Azul de Toluidina de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	58
Figura 20. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Azul Alcian de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	59
Figura 21. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación adipogénica en monocapa con Sudan III de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Proteínas expresadas en células madre mesenquimales.....	6
Tabla 2. Clasificación de los factores solubles.....	10
Tabla 3. Composición de los medios de cultivo ensayados en estudios comparativos de proliferación celular.....	34
Tabla 4. Factores ensayados en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica, sembradas en sistemas de cultivo en monocapa.....	39
Tabla 5. Resumen de las evaluaciones de la diferencia en la intensidad del marcaje inmunocitoquímico de las monocapas de las células obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón.....	54
Tabla 6. Resumen de las evaluaciones histoquímicas de las monocapas de las células obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón mantenidas en los medios inductores ensayados.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

AGM: Aorta-Gónada-Mesonefro

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

ANOVA: Análisis de Varianza

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

bFGF: Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos

β-GP: β- glicerofosfato

BMP-X: Proteínas Morfogenéticas Óseas tipo X

X-CAM: Molécula de Adhesión Celular tipo X

CD29: Marcador β1-Integrina

CD105 / CD173 / CD166: Endoglina, Marcador de Superficie de Células Madre Mesenquimales

CD73 / CD90: Marcador de Superficie de Células Estromales

CD11b / CD14 / CD19 / CD34 / CD45 / CD79: Marcador de Superficie de Células Hematopoyéticas

CD151 / CD49: Marcador de Superficie de Células Condrogénicas

C/EBP: CCAAT / Potenciador de Proteínas de Unión

CIF-X: Factores Inductores de Cartílago tipo X

CMA: Células Madre Adultas

CME: Células Madre Embrionarias

CMH: Células Madre Hematopoyéticas

CMM: Células Madre Mesenquimales

CPM: Células Progenitoras Mesenquimales

CREB: Proteína de unión a un elemento de respuesta a AMPc

DAB: Diaminobencidina

Dkk – 1: Dickkop – 1 Inhibidor de la Vía de Señalización Wnt.

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidad Óptica

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EMA: Antígeno de Membrana Epitelial

FA: Fosfatasa Alcalina

FGFs: Factores de Crecimiento Fibroblásticos

GAGs: Glicosaminoglicanos

H2: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Ratón

Hhs: Proteínas Hedgehog

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos. Antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Humanos

H2: Antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Roedores

IBE: Instituto de Biología Experimental

IBMX: Isobutilmetilxantina

IGF-X: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo X

IL: Interleucina

INHRR: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel

ISCT: Internacional Society Cellular Therapy

KGF: Factor de Crecimiento de Queratinocitos

LFA-X: Antígeno de Asociación Leucocitaria tipo X

LSAB: Marcaje Estreptavidina-Biotina

MA: Membrana Amniótica

MEC: Matriz Extracelular

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MO: Médula ósea

MP: Proteínas Morfogenéticas

MTT: 3-(4,5 Dimetil, tiazol-2y1)-2,5 Bromuro de Difenil Tetrazolium

Nanog: Factores de Transcripción Esencial y Específicos en Células Pluripotentes

Oct-4: Octámeros de proteínas de unión 4

OP-X: Proteínas Osteogénicas tipo X

PBS: Solución Buffer Fosfato

PGs: Proteoglicanos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PM: Peso Molecular

PPARx: Proliferador de Peroxisomas – Activador del Receptor tipo X

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SD: Desviación Estándar

SFB: Suero Fetal Bovino

SH-X: Marcador de Superficie de Células Madre Mesenquimales tipo X

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

SSEA-X: Antígeno Embrionario Estadío – Específico tipo X

Stro-1: Glicoproteínas específicas que reconocen a células estromales

TGF-X: Factor de Crecimiento Transformante tipo X

TRA-X: Antígeno de Rechazo Tumoral tipo X

UFC-F: Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastoides

VLA-X: Integrina de Activación Tardía

Wnts: Proteínas Internas Wingless.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición, clasificación y potencialidad de las células madre

La comprensión de las células es un objetivo importante en muchas investigaciones. Con el conocimiento de la comunicación y el comportamiento celular, se pudo comenzar a entender cómo funcionan las comunidades de células como un tejido, y los tejidos como órganos (French y col., 1998). Para los investigadores la necesidad de conocer los procesos propios de las células los llevo a crear técnicas para lograr el aislamiento de éstas con el fin de obtener poblaciones que pudiesen ser mantenidas *in vitro* (Campos, 2004; Alaminos y col., 2007).

La célula es la unidad básica funcional y estructural de la vida. Para su supervivencia, cada célula debe mantener unas condiciones bioquímicas esenciales a pesar de los cambios extracelulares. Las células cuya función general es la misma, están unidas entre sí por cantidad variable de matriz extracelular formando tejidos. La combinación de dos o más tejidos da lugar a la constitución de las unidades funcionales de mayor tamaño denominadas órganos y los conjuntos de éstos, cuyas funciones están interrelacionadas constituyen un organismo (Jones, 2003). Las células se caracterizan, en general, por tener una morfología determinada, una actividad metabólica bien definida y una función particular de acuerdo con el tipo de tejido y órgano al cual pertenecen, variando dentro de determinados límites el tipo celular del que se trata (Freshney, 2000). Todo ser vivo está formado y constituido por ellas, por sus derivados y por productos de su actividad, y todas estas poseen la misma información genética. Sin embargo, no todas se comportan de la misma manera y algunas tienen aun la capacidad de generar nuevos tejidos a lo largo de la vida posnatal; capacidad semejante a células de un embrión en gestación. A estas células se les denomina, células madre (Friedenstein y col., 1990; Arévalo y col., 2007).

En síntesis, las células madre son aquellas células indiferenciadas, dotadas simultáneamente de la capacidad de auto-renovación y de originar células hijas que pueden permanecer en estado indiferenciado o bien, pueden comprometerse en determinadas rutas de desarrollo, convirtiéndose finalmente a través de la diferenciación, en tipos celulares especializados, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional

(Weissman y col., 2001; Giraldo y col., 2003; Raff, 2003; Bobis y col., 2006; Dominici y col., 2006; Gimble y col., 2007).

Según el nivel de desarrollo del organismo en donde se encuentran, poseen la capacidad de generar uno o más tipos de células especializadas, por lo que se han sido clasificadas según su *potencialidad* (Figura 1), entendiéndose esto como la capacidad intrínseca que poseen de generar todos, uno o diversos tipos celulares; en base a lo que se consideran en mamíferos cuatro tipos de células madre: 1) totipotentes como el cigoto, las cuales son capaces de producir todos los tipos celulares que darán origen a un individuo completo, así como también al linaje germinal y a los tejidos que darán lugar a las membranas extraembrionarias. En sentido estricto solamente los primeros tres días después de la fertilización, constituirían células madre totipotenciales ya que al desarrollarse el blastocisto hay una reducción de la potencialidad; 2) pluripotentes presentes en la masa celular interna del blastocisto, las cuales pueden generar células diferenciadas a cualquier linaje celular de las tres capas embrionarias, así como del germinal y el saco vitelino; 3) multipotentes que se encuentran en general en tejidos adultos, son células con capacidad limitada de diferenciación, dando origen a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa o linaje embrionario del cual se derivó el tejido en el que residen; y 4) unipotentes como los eritroblastos, las cuales pueden dar origen únicamente a un tipo de célula particular (Weisman y col., 2001; Winslow, 2001; Raff, 2003).

Por mucho tiempo se creyó que el potencial de diferenciación de una célula estaba restringido únicamente al tejido de origen, sin embargo; desde hace algunos años, diversos estudios demostraron que las células madre de un tejido específico, si bien se diferencian predominantemente hacia linajes característicos del origen embrionario al cual pertenecen, también pueden dar origen a progenitores celulares no relacionados (Minguell y col., 2001; Jiang y col., 2002a; Raff, 2003; Bieback, 2008). Esta capacidad de cambio actualmente se conoce como *Fenómeno de Plasticidad* y le confiere a la célula la capacidad de reprogramar la expresión de los genes ligados al proceso de diferenciación, en función del microambiente circundante. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre, aún no ha sido dilucidado completamente (Beresford y col., 1992; Verfaillie y col., 2002).

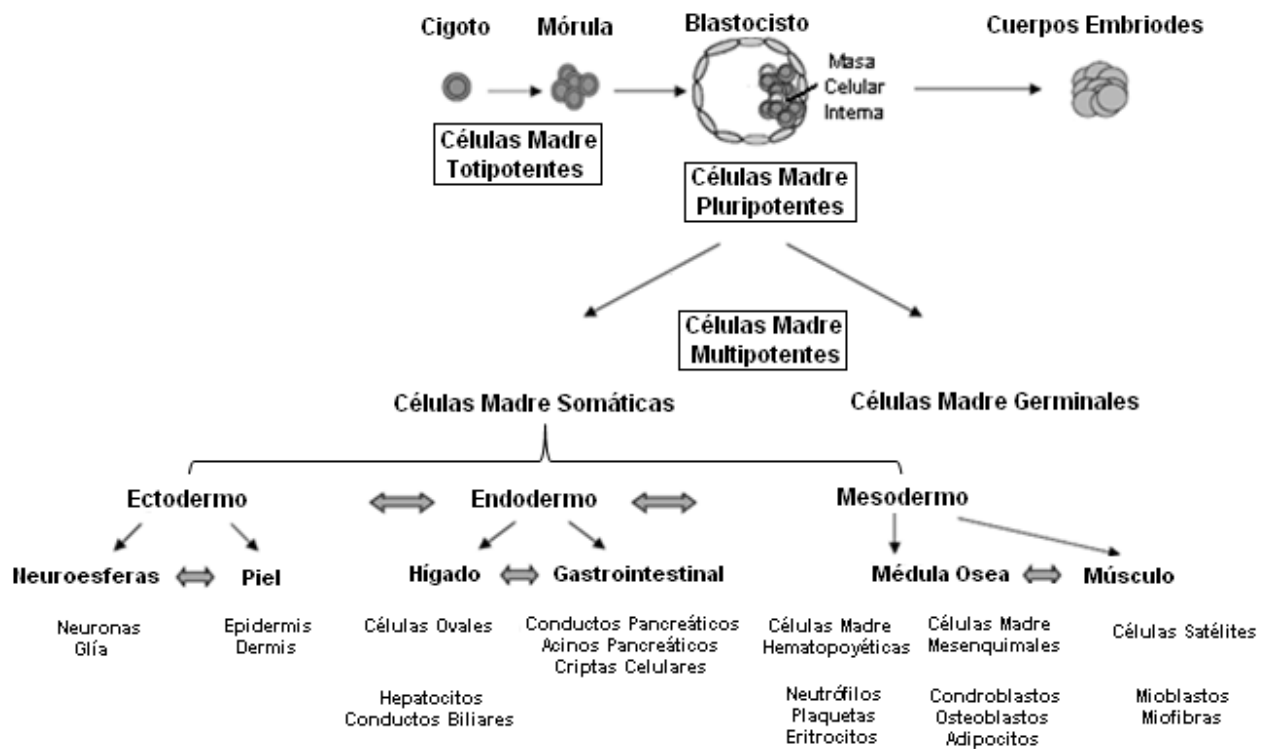


Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencialidad. Tomado de Prósper, 2006 y modificado por Meyer y Merentes, 2011c.

Las células madre también se pueden clasificar de acuerdo a su origen, ya sea del embrión o de un organismo adulto; de ahí que se hable de células madre embrionarias y de células madres adultas (Prósper, 2006; Riaño y col., 2007; Bianco y col., 2008).

Las células madre embrionarias (CME) se derivan de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio como fue descrito por Thomson y colaboradores en 1998, de los esbozos gonadales del embrión o bien de la cresta gonadal; las cuales tienen el potencial de generar cualquier célula del cuerpo, siendo consideradas pluripotentes. Pueden ser aisladas fácilmente, ser establecidas en un corto periodo y amplificadas mediante un cultivo de crecimiento que se considera un cultivo primario el cual conserva características similares a las de su tejido de origen y mantienen su estabilidad cromosomal (Nagy y col., 1990).

En el caso de las células madre adultas (CMA), éstas son poblaciones celulares menores, capaces de adquirir características fenotípicas y funcionales como respuesta a los cambios y estímulos del microambiente donde se desarrollen. Son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos y órganos adultos y que

poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células del tejido en el que se ubican, por lo tanto han sido consideradas células multipotentes (Prósper, 2004). En un individuo adulto se conocen hasta ahora unos 22 tipos distintos de células madre, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste o dañados, además de constituir un reservorio que se encuentra en los tejidos conectivos de la mayoría de los órganos implicados en el mantenimiento y reparación tisular. Estas células son reconocidas por el sistema inmune y por lo tanto producen activación del mismo (Chamberlain y col., 2007), sus divisiones son finitas dando origen a cultivos finitos los cuales tienen un tiempo de vida limitado, por lo tanto solo viven después de un número de pasajes determinados y pueden poseer mutaciones que se manifiestan para el momento de la recolección (Beyer y Da Silva, 2006; Bianco y col., 2008).

Debido a las limitaciones que presentan ambos tipos de células madre, se han buscado alternativas que no acarreen complicaciones éticas y morales, sean de fácil acceso sin que suponga ningún riesgo para el donante, provean un material suficiente y numeroso y favorezca desde el punto de vista inmunológico, la compatibilidad. Una nueva fuente que cumple con todos estos requisitos y permite el desarrollo de investigaciones que conlleven a nuevas terapias celulares y al mejoramiento de las ya existentes, es la membrana amniótica (MA), la cual es un tejido descartable, rica en células madre mesenquimales (CMM) (Niknejad y col., 2008; Mihy y col, 2009; Meyer y Merentes, 2011a).

1.2. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales, ya sean embrionarias o adultas, han sido definidas como una población de células capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológica sino también funcionalmente, siendo consideradas multipotentes. A pesar de su probada capacidad para diferenciarse hacia tejidos derivados del mesodermo y neuroectodermo (Figura 2), las células madre mesenquimales no se diferencian a tejido derivado del endodermo y por lo tanto, no se pueden considerar células madre pluripotenciales (Caplan y Bruder, 2001; Prósper, 2004).

Las células madre mesenquimales del tejido embrionario son las células precursoras del tejido conjuntivo en general: la capacidad de diferenciación y especialización de estas células multipotenciales, da

lugar a los diferentes tipos de tejidos conectivos especializados, excepto a el tejido hematopoyético; las que no se especializan forman los tejidos conectivos laxo (tejido mucoso, tejido reticular y el propio tejido mesenquimal) y denso (regular e irregular). Estos procesos de regeneración y proliferación son inducidos tras la formación de desmosomas y la secreción de factores de crecimiento y citocinas (Chamberlain y col., 2007).

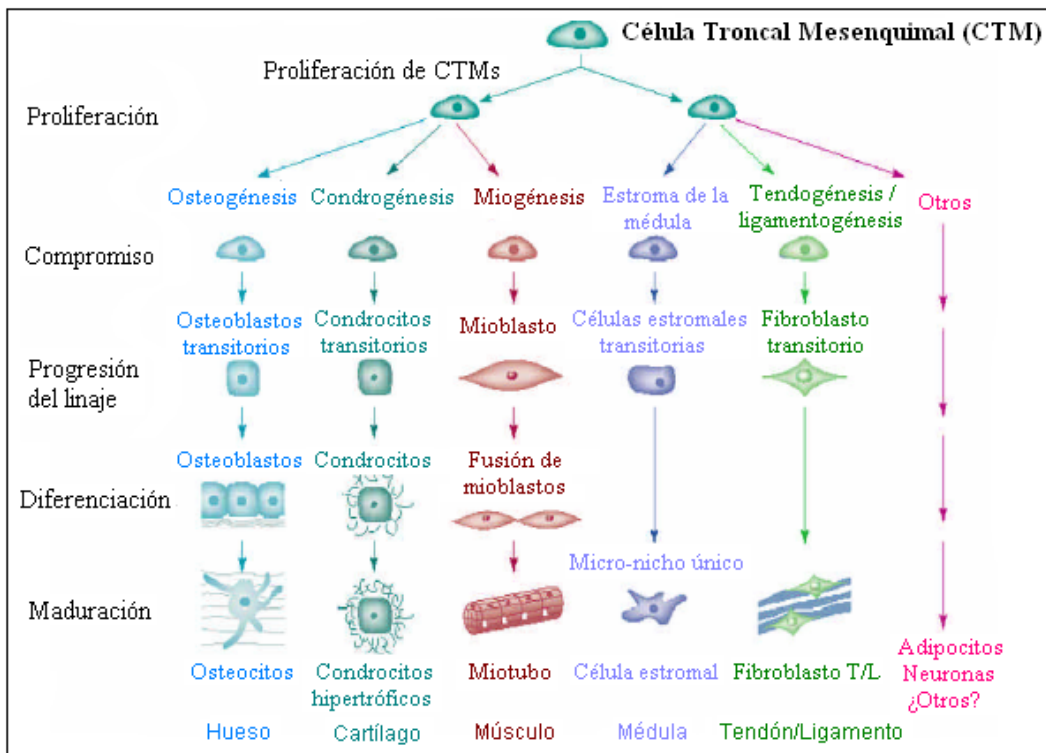


Figura 2. Diferenciación de células madre mesenquimales en múltiples linajes mesodérmicos. Tomado y modificado de Caplan y Bruder, 2001.

Los progenitores mesenquimáticos son un grupo de células madre, aisladas y caracterizadas en 1974 por Friedenstein y colaboradores, quienes inicialmente las obtuvieron de la médula ósea mediante la propiedad física que poseen de adherirse a superficies plásticas de cultivo, formando así las conocidas Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (UFC-F) y las describieron entonces como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia tejidos funcionales de origen mesodérmico de varios linajes celulares, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos (Pittenger y col., 1999; Jiang y col., 2002b; Flores y col., 2006; Bianco y col., 2008). Según Riaño

y colaboradores en 2007, la capacidad de adherencia al plástico por sí sola no es suficiente para la purificación y caracterización de estas células.

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para caracterizar las células madre mesenquimales; primero, éstas células deben ser adherentes en cultivos con sustrato plástico; segundo, expresar antígenos de superficie de células mesenquimales CD105 y CD173, antígenos presentes en células estromales CD73 y CD90, y marcadores de superficie de células madre mesenquimales SH-1, SH-2, SH-3 y SH-4, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79; y tercero, las células madre mesenquimales deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, bajo condiciones estándar de cultivo. Estas células además, expresan gran variedad de proteínas en su superficie celular que incluyen integrinas, receptores de factores de crecimiento, receptores de citocinas, moléculas de matriz y moléculas de adhesión (Tabla 1). La adhesión de las células a la superficie del material es regulada por algunas de estas moléculas (Fuentes, 2008).

Tabla 1. Proteínas expresadas en células madre mesenquimales. Toma Tomado de Fuentes, 2008 y modificado por Meyer y col., 2011c.

Grupo	Proteínas
Moléculas de adhesión	ALCAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, L-selectina, LFA-3, NCAM, HCAM y VCAM
Factores de crecimiento y receptores de citocinas	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, interferon α R, Factor de necrosis tumoral α 1-R, Receptor de transferían
Integrinas	VLA- α 1, VLA- α 2, VLA- α 3, VLA- α 5, VLA- β , β 4- integrina
Marcadores de matriz extracelular	Colágeno tipo I, II, IV y V, Proteoglicanos, Laminina, Ácido Hialurónico

Se piensa que las células madre residen en un área específica de cada tejido, en donde permanecen quiescentes hasta ser activadas (Crisan y col., 2008). Las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas (CMH) se originan en el mesodermo intermedio (Figura 3) que rodea a la aorta en una región denominada aorta-gónada-mesonefro (AGM). Mendes y colaboradores en 2005 sugirieron que las CMM tienen un desarrollo embrionario paralelo y coordinado junto con las CMH. Además se ha postulado que

algunas regiones embrionarias proveen el microambiente necesario para el establecimiento y la diferenciación de células madre mesenquimales, estimulando su presencia, una coordinación funcional con las células madre hematopoyéticas.

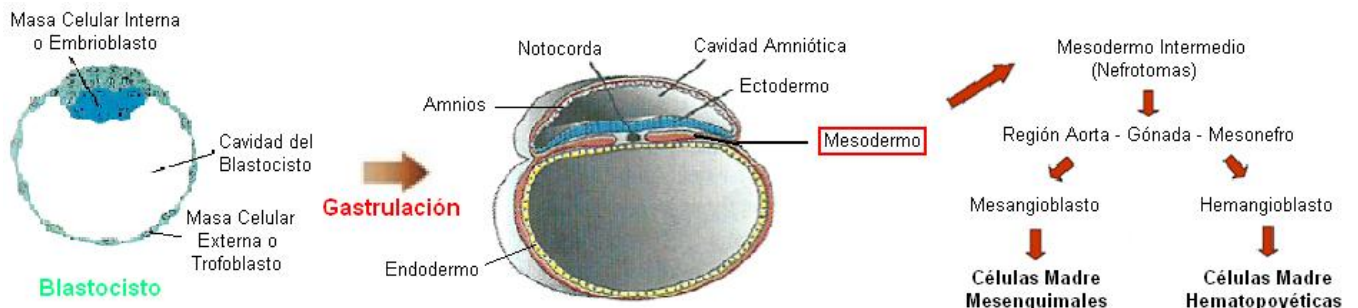


Figura 3. Ontogenia de las células madre mesenquimales. Tomado y modificado de Sadler, 2006; Fuentes, 2008.

Estas células en general, han sido aisladas de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, amnios, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal (Kern y col., 2006; Merentes, 2009). La capacidad y frecuencia de expansión de las células madre mesenquimales son limitadas y pueden disminuir con la edad, por esto, los tejidos fetales como el líquido amniótico y el cordón umbilical son una fuente óptima, rica de células madre mesenquimales (Ming-Song y col., 2004; Keating, 2006; Krampera y col., 2006; Calderón, 2007).

1.3. Microambiente celular y factores que influyen sobre el comportamiento de las células

La generación de la diversidad celular, producto de la diferenciación, constituye uno de los procesos fundamentales del desarrollo, donde cada uno de los tipos celulares de organismo, se deriva a partir de una sola célula, el cigoto. Esto implica que toda la información que se requiere para generar esta diversidad, está presente en esta célula. Sin embargo, a medida que continúa el desarrollo embrionario, ocurre una restricción progresiva en la potencialidad de las células que se originan a partir del cigoto para generar los diferentes tipos celulares que constituyen al organismo (Merentes, 2009).

En general, a medida que la diferenciación progresa, la división celular se reduce y en la mayoría de los sistemas celulares, la proliferación es incompatible con la expresión de propiedades de células diferenciadas (Spivakov y Fisher, 2007). En el organismo, las células madre se encuentran en un microambiente que está constituido por células circundantes, componentes de matriz extracelular (MEC) y diversos factores que pueden generar una amplia variedad de señales que regulan la morfología, proliferación, diferenciación y metabolismo de estas células (Li y Xie, 2005; Scadden, 2006). Esto sugiere, que el microambiente juega un papel fundamental en el mantenimiento del estado indiferenciado y en el control de la vía de diferenciación de las células madre a través de mecanismos epigénicos (Muraglia y col., 2000; Mitsiadis y col., 2007; Merentes, 2009). Actualmente esta disminución de potencialidad puede ser determinada por medio de marcadores moleculares de diferenciación específicos dependiendo del linaje que desarrollen o por medio de la expresión de las proteínas específicas de CME, como lo son; los altos niveles de actividad telomerasa, receptor del factor inhibidor de la leucemia, gen 1 específico de las células madre embrionarias, antígeno embrionario específico de los estadios tempranos del desarrollo como SSEA-4, antígeno de rechazo tumoral (marcadores de carcinoma embrionario) TRA -1-60 y TRA-1-81 (Reubinoff y col., 2000), glicoproteínas específicas que reconocen a células estromales como Stro-1; y Nanog y Sox-2, identificados como factores de transcripción esenciales y específicos en células pluripotentes (Yu y Thomson, 2006). Además, también muestran una alta expresión de octámeros de proteínas de unión 4 (Oct-4) (Reubinoff y col., 2000; Chambers y col., 2003; Rubio y col., 2005; Carlin y col., 2006; Watabe y Miyazono, 2009).

La transdiferenciación de la células madre en células de distintos tejidos o de procedencia diferente, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, se debe a la influencia de diversos factores solubles sobre las células, los cuales pueden ser suministrados al medio de cultivo (en el caso *in vitro*) o encontrarse en el microambiente donde son trasplantadas (en el caso *in vivo*) y son capaces de ejercer efecto en la activación de genes silenciados (Schuldiner y col., 2000; Forbes y col., 2002; Zamudio, 2005; Rodríguez y col., 2006; Calderón, 2007). Estos factores son principalmente producidos de manera natural y secretados por las células a su microambiente inmediato o al torrente sanguíneo, teniendo efecto estimulador o inhibidor, actuando

sobre receptores de células dianas por vía: 1) Endocrina donde las células secretoras liberan factores a la sangre, alcanzando a distancia células dianas; 2) Paracrina donde una célula produce una molécula señal la cual difunde hasta una célula diana vecina o adyacente y 3) Autocrina donde ocurre unión de una célula y una molécula señal que es producida por ella misma. En cultivo celular solo ocurren las últimas dos vías y son responsables, en parte, de la inducción a la diferenciación y transdiferenciación de las células.

Además, la interacción célula – célula influye en la transcripción de señales y vía de especialización de las células vecinas. Durante la diferenciación celular hay periodos críticos donde adquiere fundamental importancia el contacto con otras células o con productos que sintetizan, comprometiendo uniones brechas donde metabolitos, mensajeros secundarios, calcio o cargas eléctricas pueden estar intercambiándose entre ellas. Esta interacción probablemente armoniza de alguna forma el patrón de expresión de un fenotipo en una población, más que iniciar su expresión. Esto ocurre a altas densidades celulares, ya que de esta manera las células se encuentran más cercanas entre sí y se establece una mayor comunicación entre ellas y supone la generación y recepción de señales moleculares que pueden activar o desactivar la síntesis o expresión de proteínas (Freshney, 2000; Gilbert, 2006).

La matriz extracelular es una región crítica para la mayor parte del desarrollo animal. La adhesión y migración celular, depende de la capacidad de estas para formar uniones a dicha matriz, la cual consiste en un arreglo de macromoléculas secretadas por células circundantes, formando una región de material no celular en el intersticio entre ellas. La matriz extracelular puede regular el comportamiento de las células a través de su composición, por medio de interacciones sinérgicas entre factores de crecimiento y moléculas de matriz y por los diferentes tipos de receptores presentes en la superficie celular (integrinas) que median la adhesión de las moléculas a la membrana celular, disparando señales intracelulares específicas que regulan la transcripción de genes relacionados con el crecimiento, migración y estado de diferenciación (Geneser, 1993; Gilbert, 2006; Rodríguez, 2010).

De igual manera, el sustrato de cultivo puede influir en la polaridad que adquieren las células y esta a su vez puede determinar su forma y distribución de manera tal, que los productos de secreción se liberan apicalmente y los receptores de señales y transportadores de nutrientes se localizan de manera basal. La

tensión de oxígeno también juega un papel determinante en el proceso de diferenciación, estimulando la activación de genes asociados a la expresión de un fenotipo celular particular.

Entonces, el uso de estos factores dentro de los cuales se encuentran los fisiológicos y no fisiológicos (Tabla 2), junto con la interacción célula – matriz extracelular, la interacción célula – célula ya sea homóloga o heteróloga, la polaridad y la forma celular y la tensión de oxígeno, se han señalado como responsables de la regulación de la proliferación y diferenciación celular *in vitro* (Adam y Watt, 1993; Freshney, 2000).

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

Factores Solubles Fisiológicos	Factores Solubles No Fisiológicos
Esteroides: Hidrocortisona y retinoides.	Compuestos planos – polares: DMSO, entre otros.
Hormonas peptídicas: Melanotropina, Tirotropina e Insulina.	Drogas citotóxicas: Genisteína, Mitomicina C, entre otras.
Citocinas: Interferones, TGF, IL, entre otras.	Modificadores de la señal de transducción: Glioma y Ésteres de Forbol.
Vitaminas: E, K, D ₃ , entre otras.	
Minerales: Calcio	

Para realizar los estudios *in vitro*, sea establecimiento de cultivos o inducciones, es necesario el mantenimiento de las células en sistemas de cultivo apropiados de acuerdo a lo que se desee realizar (Meyer y col., 2011d). El tipo de cultivo a aplicar, toma en cuenta si las células son anclaje – dependientes o independientes y la biología de estas. Para la diferenciación de las células madre mesenquimales a distintos tejidos se utilizan suplementos especiales en el medio de cultivo base. Por ejemplo para la diferenciación osteogénica, el medio basal debe ser suplementado con dexametasona, β - glicerofosfato (β -GP), ácido ascórbico y suero fetal bovino (SFB). En presencia de estos suplementos las células forman agregados, adquieren un cambio de morfología, aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y producen depósitos de cristales de hidroxiapatita. Para la inducción de las células madres mesenquimales a precursores adipogénicos, el medio basal se enriquece con dexametasona, isobutilmetilxantina (IBMX), insulina recombinante, indometacina y SFB; donde se observa la formación de vacuolas lipídicas mediante la coloración con aceite rojo (Estrada y Venegas, 2007). La diferenciación condrogénica ocurre cuando las células crecen suplementando el medio basal con factor de crecimiento transformante beta (TGF- β -1), dicha

diferenciación se comprueba mediante la secreción de proteoglicanos específicos de cartílago teñidos con safranina O (Pittenger y col., 1999; Chamberlain y col., 2007).

1.4. Diferenciación de las células madre mesenquimales hacia linajes de origen mesodérmico

El mesénquima embrionario da origen a los diversos tejidos conectivos del organismo. El mesodermo, la capa media del disco embrionario trilaminar, da origen a casi todos los tejidos conectivos del adulto. Por medio de la migración y la proliferación de las células mesodérmicas y las células específicas de la cresta neural en el embrión joven se forma un tejido primitivo denominado mesénquima.

Durante las primeras semanas de gestación, se desarrollan todos los órganos y estructuras corporales de sostén. Lo primero en desarrollarse es la cabeza y los esbozos de vértebras, los cuales están compuestos por acumulación de células madre mesenquimales que por acción de diversos factores paracrinos, activación de factores de transcripción y señalización interna, facilitado además por la alta densidad celular, comienzan a diferenciarse. Todas las células del tejido conectivo, derivan de estas células madre mesenquimales indiferenciadas. La manera en que estas células proliferan y se organizan, determina el tipo de tejido conectivo maduro que se formará en un sitio dado (Ross y Pawlina, 2007).

Aunque no está totalmente clara la regulación y la transición abrupta de células madre de un estado quiescente a uno activado en términos de proliferación, migración, diferenciación y secreción de la matriz; el control de los mecanismos moleculares implicados en este cambio, viene dado por diferentes morfogenes. Estos son señales secretadas a nivel extracelular, que dirigen la morfogénesis durante las interacciones celulares. Las vías de señalización morfogenética incluyen cinco clases de genes altamente conservados durante la evolución: proteínas morfogenéticas (MP), factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), proteínas internas Wingless (Wnts), proteínas Hedgehog (Hhs) y las moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Estas familias de genes están principalmente involucradas en el inicio de dicho proceso que lleva finalmente a la diferenciación (Wise y col., 2000; Martin y Watt, 2003).

El cartílago es un tejido conectivo especializado que se encuentra en la epífisis de huesos largos y tráquea, bronquios, nariz, orejas, laringe y en discos intervertebrales. Se desarrolla a partir del mesodermo,

donde las células madre mesenquimatosas se redondean formando cúmulos celulares densos con escaso material intercelular. Este conjunto de células precartilaginosas se llama blastema y corresponde a los centros de condricación. Las células del blastema son inducidas a sintetizar matriz cartilaginosa con lo que comienza inmediatamente la producción de colágeno tipo I y II, proteoglicanos y los glicosaminoglicanos. Además, estas sintetizan localmente factores de crecimiento transformantes tipo beta 1 (TGF- β -1) y factores inductores de cartílago tipo A y B (CIF-A y CIF-B) los cuales inducen la condrogénesis y la producción de colágeno tipo II en cultivos; estos son reconocidos por los receptores específicos de membrana de las células presentes en la matriz, estimulando el compromiso y la proliferación de células condroprogenitoras (Seyedin y col., 1986; Miura y col., 1994). A partir de ese momento se les llama condroblastos; estas aumentan de tamaño y se separan progresivamente a medida que aumenta la cantidad de matriz sintetizada, abriéndose paso entre la sustancia fundamental y el tropocolágeno, que se polimeriza fuera de la célula para formar colágeno. Aquí los condroblastos se diferencian a condrocitos que son células cartilaginosas maduras; mientras que las células madre mesenquimales externas que rodean la masa condrogénica, forman el pericondrio (Geneser, 1993). Tanto las células del pericondrio como los condrocitos, retienen su capacidad de división y son los responsables del crecimiento por aposición e intersticial, respectivamente, que sufre el cartílago posterior a su formación. Este proceso ocurre casi en todo el embrión, formando así el esqueleto cartilaginoso a partir del cual se originaran la mayoría de los huesos largos, por osificación endocondral, pero aún así, existen zonas donde las células madre mesenquimales no se diferencian y permanecen agrupadas, sufriendo luego una osificación intramembranosa la cual da origen a los huesos planos (Ross y Pawlina, 2007; Wieismann y col., 2006).

El proceso de osificación consiste básicamente en el reemplazo del tejido cartilaginoso por tejido óseo. El hueso es un tejido conectivo especializado que provee soporte y protección a los órganos del cuerpo.

La formación intramembranosa se produce gracias a una condensación de las células madre mesenquimales comprometidas hacia el linaje osteogénico, las cuales se encuentran en contacto por medio de largas prolongaciones. Estas migran y se acumulan en regiones específicas donde algunas de ellas se diferencian en osteoblastos que al poco tiempo comienzan a secretar colágeno (principalmente colágeno tipo

l) y otros componentes de matriz ósea orgánica sin calcificar, la cual se denomina osteoide y consta de proteoglicanos, fibras de colágeno y sustancia fundamental. Los osteoblastos que están embebidos dentro del osteoide se comunican entre sí por medio de finas prolongaciones y al momento de la calcificación por fosfato de calcio, quedan atrapados formándose un pequeño espacio propio del hueso que se denomina canalículo; al mismo tiempo, el osteoblasto de la zona de calcificación pierde su capacidad de metabolizar matriz ósea y se convierte en osteocito. Este osteoblasto es rápidamente reemplazado por otro, el cual se encuentra encima del nuevo osteocito dándole de esta manera, la estructura (por capas) al hueso y haciendo que aumente su grosor (Wieismann y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

La osificación endocondral se diferencia de la intramembranosa en la manera en que este proceso involucra un paso intermedio donde el cartílago es quien regula el crecimiento y desarrollo del hueso. La formación dentro del embrión comienza con el desarrollo de un modelo de cartílago el cual crece por yuxtaposición aumentando de longitud y de manera intersticial aumentando de grosor; seguidamente los condrocitos de este cartílago se hipertrofian al ser impedida la difusión de nutrientes dando como resultado el crecimiento de lagunas y reducción de los tabiques de matriz cartilaginosa intercalados que se calcifican. El pericondrio se vasculariza haciendo que las células condrogénicas pasen a ser osteoprogenitoras formando los osteoblastos, los cuales elaboran matriz ósea sobre la superficie espicular del cartílago calcificado. Esta matriz se calcifica formando un complejo de cartílago y hueso calcificado (Wieismann y col., 2006)

Entre los componentes no estructurales de la matriz ósea, tanto de formación intramembranosa como endocondral, de igual manera cabe destacar el efecto de factores de crecimiento transformantes tipo beta (TGF- β) que constituyen una superfamilia en la que se incluyen las proteínas morfogenéticas óseas tipo 7 (BMP-7), también conocidas como proteínas osteogénicas tipo 1 (OP-1), las cuales inducen dicha diferenciación. Estas se sintetizan localmente por células progenitoras comprometidas hacia el linaje osteogénico y son adsorbidas por las células circundantes presentes en la matriz, estimulando la proliferación de otras células osteoprogenitoras; además incrementan el porcentaje de colágeno y osteopontina en dicha población e influyen en la maduración celular al elevar los niveles de fosfatasa alcalina que constituye un indicador de la actividad celular (Peris y col., 2006).

Por último, el tejido adiposo es un tejido conectivo especializado, difuso y con gran actividad metabólica, puesto que sus lípidos están capacitados para almacenar energía. Existen dos tipos de tejido adiposo; el tejido adiposo unilocular representa la mayor parte del tejido adiposo del organismo y las células que lo conforman, contienen una vacuola lipídica que ocupa la mayoría del citoplasma y el tejido adiposo multilocular, el cual es más escaso y es llamado así porque sus células contienen múltiples gotas pequeñas de lípidos (Geneser, 1993). Mediante la expresión de PPAR γ (Proliferador de Peroxisomas – Activador del Receptor Gamma), las células madre mesenquimales quedan predestinadas a convertirse en adipoblastos y estos en lipoblastos (preadipocitos). Los lipoblastos producen una lámina basal externa y comienzan a acumular gotas de lípidos en su citoplasma. En el tejido adiposo unilocular, estas gotas confluyen para formar una única inclusión lipídica grande que por último ocupa casi toda la célula madura y comprime el núcleo y el citoplasma con sus orgánulos contra la membrana plasmática en la periferia celular. En el tejido adiposo multilocular las gotas lipídicas individuales, permanecen separadas (Ross y Pawlina, 2007).

1.5. Membrana amniótica: Características histológicas, funcionales e inmunológicas

Recientemente, se demostró que el estroma de las membranas extraembrionarias también contiene células de tejidos embrionarios y extraembrionarios diferenciadas y no diferenciadas derivadas del ectodermo, del mesodermo y del endodermo fetal. Hay cuatro membranas extraembrionarias que se encuentran generalmente en vertebrados: el saco vitelino, el alantoides, el amnios y el corion. Estas membranas no intervienen en la formación de ningún tejido embrionario, salvo porciones del saco vitelino y alantoides (Díaz y col., 2010; Niknejad y col., 2008).

El amnios o membrana amniótica, es la membrana extraembrionaria más interna y se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico, participando en el mantenimiento de la homeostasis de éste. Es un saco membranoso avascular, metabólicamente activo, el cual reviste y envuelve al feto y funciona como un filtro y amortiguador, protegiéndolo contra infecciones, traumas y toxinas (Dobreva y col., 2010). En la actualidad, existe evidencia que demuestra la presencia de células progenitoras de naturaleza mesenquimal presentes en el estroma de la membrana amniótica. Éstas se expanden fácilmente en cultivo, tienen alta

capacidad de autoreplicación, mantienen la estabilidad genética y poseen potencial diferenciador hacia elementos celulares derivados de al menos dos capas embrionarias; representando una nueva fuente de células que podría tener múltiples aplicaciones en ingeniería de tejidos y en la terapia celular (Linju y col., 2005; Alviano y col., 2007; Díaz y col., 2007; Niknejad y col., 2008; Mihiu y col., 2009).

Luego de la fecundación, para que se lleve a cabo la formación de estas membranas extraembrionarias es necesario que ocurra el proceso de implantación, el cual consiste en la penetración o íntima adhesión del blastocisto al revestimiento mucoso de la pared uterina (Fisher y col., 1989; Moore y Persaud, 2009; Dobrevá y col., 2010). El embrión está compuesto por el epiblasto (ectodermo primitivo), rodeado por endodermo visceral en la mitad inferior del huevo cilíndrico y por ectodermo extraembrionario, envuelto por endodermo visceral en la mitad superior. El epiblasto dará lugar al embrión propiamente dicho, así como al ectodermo amniótico y al mesodermo extraembrionario del corion, amnios, saco vitelino visceral y alantoides. A continuación, una pequeña cavidad se forma por apoptosis en el centro del epiblasto dando lugar a una cavidad proamniótica y el embrión adquiere su forma característica de taza. La cavidad se agranda con el crecimiento del huevo cilíndrico y finalmente se enfrenta también al ectodermo extraembrionario (Figura 4A). A diferencia de los embriones discoideos de primate, después de la implantación; el embrión de roedores tiene forma de cilindro y de ahí el nombre de huevo cilíndrico. Este ha invertido sus capas germinales y el ectodermo se encuentra hacia el interior del cilindro y el endodermo se encuentra hacia el exterior (Figura 4A-C). A diferencia de los embriones discoideos de primate, después de la implantación; el embrión de roedores tiene forma de cilindro y de ahí el nombre de huevo cilíndrico. Este ha invertido sus capas germinales y el ectodermo se encuentra hacia el interior del cilindro y el endodermo se encuentra hacia el exterior (Figura 4A-C). La formación del amnios se inicia en la gastrulación, la cual comienza con la formación de la línea primitiva en la cara posterior del epiblasto a los 6 días de implantación. Poco tiempo después, el tejido mesodérmico se extiende hacia afuera desde el embrión gastrulado. Un pliegue amnio-coriónico (Figura 4B) se forma en el lado posterior del embrión, debido a la acumulación de mesodermo extraembrionario entre el ectodermo y endodermo extraembrionario visceral, empujando al ectodermo embrionario y extraembrionario a la cavidad proamniótica.

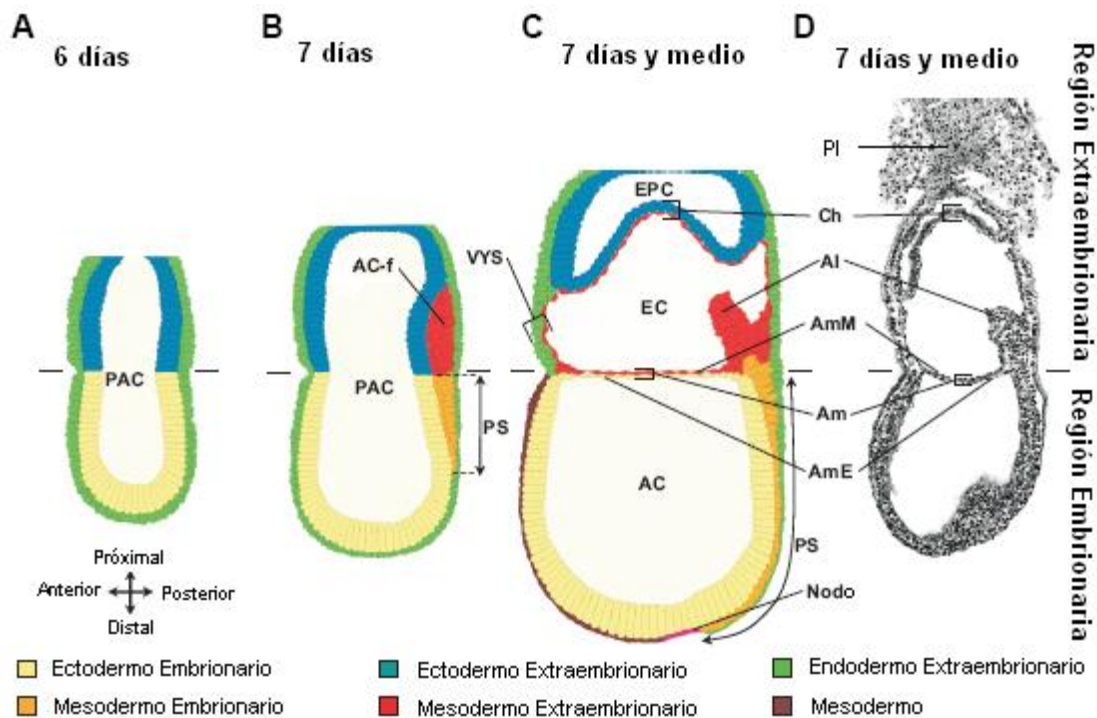


Figura 4. Representación esquemática de las etapas de desarrollo del amnios de ratón. **A:** A los 6 días de la implantación. **B:** A los 7 días de la implantación. **C - D:** A los 7 días y medio de la implantación. Abreviaciones: AC: Cavity Amniótica, AC-f: Pliegue Amnio-Coriónico, Am: Amnio, AmM: Mesodermo Amniótico, AmE: Ectodermo Amniótico, Al: Alantoides, Ch: Corion, EC: Exoceloma, EPC: Ectoplacenta, PAC: Cavity Proamniótica, Pl: Placenta, PS: Línea Primitiva, VYS: Saco Vitelino Visceral. Tomado de Dobrevá y col., 2010 Y modificado por Meyer y Merentes, 2011c.

Durante el crecimiento del corion, las membranas coriónicas dividen la cavity proamniótica en amniótica, exocelómica y ectoplacenta (Figura 4C). Cuando el corion y la ectoplacenta se encuentran, se fusionan para formar la parte fetal de la placenta (Figura 4D). Posteriormente, el ectodermo adquiere una ubicación exterior. Debido a esta rotación axial, el amnios se coloca entre el saco vitelino y el feto (Figura 5). Cabe señalar que amnios y corion se han convertido en dos membranas completamente independientes (Dobrevá y col., 2010).

Desde la superficie externa del corion se proyectan vellosidades, las cuales contienen vasos sanguíneos y le permiten a éste tener una gran área expuesta a la sangre materna. Aunque los sistemas sanguíneos fetal y materno nunca se fusionan, la difusión de las sustancias solubles puede tener lugar a través de las vellosidades. De este modo, la madre proporciona al feto nutrientes y oxígeno, y el feto envía los productos de desecho (principalmente dióxido de carbono y urea) hacia la circulación materna (Gilbert, 2005).

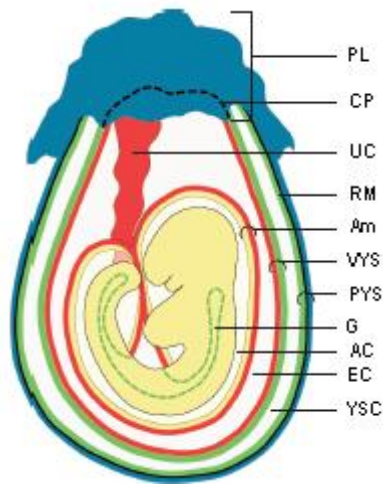


Figura 5. Representación esquemática de un feto de ratón y sus membranas extraembrionarias, a los 9 días y medio después de la implantación. Abreviaciones: AC: Cavidad Amniótica, Am: Amnios, CP: Placa Coriónica, EC: Exoceloma, G: Intestino, PI: Placenta, PYS: Saco Vitelino Parietal, RM: Membrana de Reichert, UC: Cordón Umbilical, VYS: Saco Vitelino Visceral, YSC: Cavidad del Saco Vitelino. Tomado y modificado de Dobrevá y col., 2010.

La organización histológica del corion y el amnios en humanos, roedores y primates como sistema de multicapas ha sido descrita en detalle por los estudios clásicos de Bourne en 1960. La membrana coriónica constituye la capa exterior que limita la bolsa que encierra el feto, mientras que la capa más interna de ésta, es la membrana amniótica. Está formada por una capa de epitelio cuboideo simple que descansa sobre una membrana basal gruesa y un estroma avascular (Figura 6). La membrana amniótica no contiene vasos sanguíneos o nervios y los nutrientes que requiere son suministrados directamente por difusión desde la decidua materna. Su capa más interna, más cercana al feto y en contacto directo con el líquido amniótico, se llama epitelio amniótico y se compone de una sola capa de células cúbicas uniformemente dispuestas sobre la membrana basal, las cuales derivan del ectodermo embrionario. La lámina compacta de la matriz estromal, que varía en espesor, se encuentra adyacente a la membrana basal y constituye su esqueleto fibroso principal. El colágeno de la lámina compacta es secretado por las células mesenquimales situadas en la lámina fibroblástica, las cuales derivan del mesodermo embrionario (Díaz y col., 2010). El colágeno intersticial (tipo I y III) predomina y forma haces paralelos que mantienen la integridad mecánica de la membrana amniótica. Colágeno tipo V y VI forman conexiones filamentosas entre los colágenos intersticiales y la membrana basal epitelial. La mayor fuerza ténsil del amnios es dada por los colágenos de la lámina compacta más que por el epitelio amniótico (Niknejad y col., 2008). Sin embargo, este arreglo de los colágenos más allá del intersticio y su conexión a los colágenos de la membrana amniótica basal, da fuerza extra a los tejidos expuestos a las fuerzas mecánicas, tanto de tipo

repetitivo como en los vasos sanguíneos, o de tipo continuo como el que es necesario cuando las membranas son estiradas en el periodo de gestación a término.

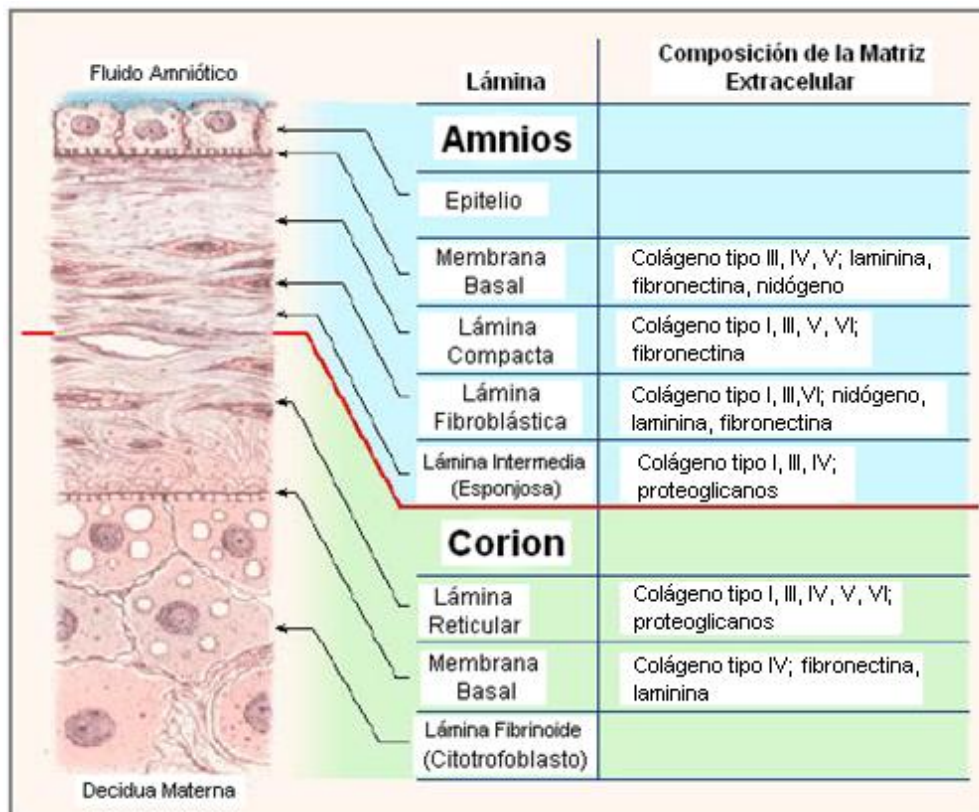


Figura 6. Esquema representativo de un corte longitudinal de amnios y corion. Adaptado de Parry y Strauss, 1998, tomado de Niknejad y col., 2008 y modificado por Meyer y Merentes, 2011c.

La capa intermedia (lámina esponjosa) de la matriz estromal se encuentra adyacente a la membrana coriónica. Su abundante contenido de proteoglicanos y glicoproteínas produce una apariencia esponjosa en las preparaciones histológicas y además, contiene una malla no fibrilar en su mayoría de colágeno tipo III (Parry y Strauss, 1998). La lámina esponjosa es rica en proteoglicanos los cuales permiten el paso del agua, facilitando el deslizamiento del amnios sobre el corion, un mecanismo que ha sido propuesto como un sistema de reparación mecánica a corto plazo (Behzad y col., 1994; French y McGregor, 1996). La matriz extracelular coriónica subyacente y las células del citotrofoblasto en la gestación a término están firmemente adheridas a la decidua materna y cuando se usan marcadores específicos para las células deciduales, es común encontrar a estas células infiltrándose a través del citotrofoblasto hacia la membrana basal.

La ultraestructura de la membrana amniótica ha sido objeto de un gran número de estudios a nivel de la microscopia electrónica de transmisión. Los principales componentes son células y matriz extracelular. Las primeras son responsables de la síntesis, degradación y recambio de la última. Las células epiteliales amnióticas sintetizan tanto el colágeno tipo III constituyente de su lámina basal, como los colágenos tipo I y III del estroma intersticial de la lámina compacta. Se ha demostrado que la producción de estos componentes de la matriz extracelular continúa hasta el término del periodo de gestación y que las células menos diferenciadas se encuentran muy cercanamente al epitelio amniótico, distribuidas en la lámina fibroblástica (Niknejad y col., 2008; Dobrova y col., 2010).

Las células de la membrana amniótica son las responsables de la secreción de los factores antibacterianos presentes en el líquido amniótico; Interleucinas-2 y lisozima, fundamentalmente y gracias a que se trata de un tejido metabólicamente activo que regula la composición del líquido amniótico; sus células producen gran variedad de compuestos activos (hormonas, expresan ARNm (ácido ribonucleico mensajero)) un gran número de factores de crecimiento (Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF) y Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF)) y citocinas. En particular, sus células madre mesenquimales se caracterizan por no sufrir transformaciones tumorales tras múltiples pases de cultivo, ni desarrollar teratomas en animales de experimentación; además presentan una muy baja expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, por lo que estas células no desencadenan respuesta inmune de rechazo, considerándoseles como buen candidato para la terapia celular alogénica (Chamberlain y col., 2007; Fontenla y col., 2008).

Debido a sus propiedades y a sus amplias posibilidades de diferenciación, las células madre embrionarias son estudiadas para su aplicación en bioingeniería tisular y reemplazo de tejidos. Actualmente, estos campos de la medicina regenerativa están haciendo uso de múltiples técnicas basadas en el aumento de la eficiencia de extracción de estas células y su diferenciación, así como en el desarrollo de materiales que sean biocompatibles y bioabsorbibles, y además sirvan de soporte para el desarrollo de distintos tejidos y en un futuro, de órganos (Naughton, 2002; Arbós, 2004; Ibarra y col., 2007; Meyer y col., 2011b).

2. ANTECEDENTES

El término de célula madre aparece por primera vez en un trabajo publicado por Lepak en 1948 (Citado en Araos, 2008), en el que reporta un caso de transmutación de una leucemia mieloide en una leucemia temprana de células indiferenciadas. A mediados de 1980, los científicos comprendieron que las células eran los elementos fundamentales y básicos que mantenían el buen funcionamiento del organismo, y que dichas células se encargaban de generar otras células. Esta sorprendente observación fue sin embargo negada sistemáticamente por investigadores posteriores, aún hasta tiempos recientes. Este descubrimiento fue continuado en los primeros años de la década de 1990 gracias a la comprensión de que algunas células también se encargaban de generar células sanguíneas.

La historia de las células madre embrionarias se inicia con el estudio de los teratocarcinomas; estos son extraños tipos de tumores gonadales que contienen varios tipos de tejidos derivados de las tres capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo, ectodermo). Aunque la idea de utilizarlas apareció desde los 70, nunca han sido vistas como ideales debido a que provienen de tumores y presentan aneuploidías. Evans y Kauffman en 1981 (Citado en Robertson, 1987) aislaron por primera vez células madre embrionarias a partir de blastocisto murinos introduciendo el término de células madre embrionaria para distinguirlas de las células madre provenientes de teratocarcinomas. En el año de 1998, Thomson y colaboradores logran establecer las primeras líneas de células madre embrionarias humanas, aislada a partir de blastocisto, denominándolas H1, H7, H9 y H14 las cuales mostraban un cariotipo estable durante los subcultivos. Además reportaron su capacidad de diferenciación a las tres capas germinales por medio de la inyección de estas en ratones, desarrollando teratomas donde se identificaron todos los tejidos.

Las células madre adultas no son estudiadas hasta la década de los 60, cuando se descubrieron dos poblaciones de células diferentes en punciones de la médula ósea en humanos; una de estas poblaciones daba origen a todas las células sanguíneas y la otra a distintos tipos celulares de origen mesodérmico. En 1966, Harris (Citado en Grant y col., 2002) hace una descripción morfológica tentativa de la célula madre hemopoyética, identificándola como un linfocito pequeño, con escaso citoplasma, intensamente basófilo y en

1967 Cohnheim (Citado en Jiang y col., 2002b) hipotetiza, a partir de observaciones en animales, que la reparación de órganos lesionados se lograba a partir de células que migraban a través de la sangre, provenientes de la médula ósea (MO). Trabajos publicados recientemente, sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de lo esperado, existiendo células troncales pluripotenciales en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias. Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse pluripotencial tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y, finalmente, que se produzca un establecimiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. En estos momentos no existe ningún estudio que cumpla todos estos criterios de forma estricta, aunque algunos trabajos indican de manera bastante evidente la posible existencia de células madre adultas pluripotenciales.

El término célula madre mesenquimal fue descrito por primera vez por Friedenstein y colaboradores en la década de los 70, refiriéndose a células aisladas de médula ósea y otros tejidos, como células adherentes en cultivo (Pittenger y col., 1999; Flores y col., 2006). Posteriormente estas células fueron caracterizadas por expresar antígenos de superficie como CD73, CD90 y CD105 en ausencia de marcadores hematopoyéticos y además tienen la capacidad de diferenciarse en células como adipocitos, osteocitos y condrocitos en condiciones específicas de cultivo (Keating, 2006; Brinchmann, 2008; Ho y col., 2008).

Con respecto a la membrana amniótica, su organización y anatomía microscópica han sido descritas en detalle en 1960 por Bourne como un sistema de multicapas. La matriz extracelular coriónica subyacente y las células del citotrofoblasto en la gestación a término están firmemente adheridas a la decidua materna.

Un trabajo comparativo entre preparaciones de células epiteliales amnióticas y cultivos de células mesenquimales confluentes aisladas del estroma de la misma, fue realizado en 1991 por Casey y colaboradores. Se reportó que la síntesis de los colágenos intersticiales era una función primaria, pero no exclusiva, de las células mesenquimales más que de las células epiteliales (Miki y col., 2005). Se observó que

la mayor actividad de síntesis del mesénquima para el colágeno intersticial era temprana en la gestación, declinando al término de éste. El uso de un sistema de cultivo tridimensional, por otra parte, los cuales mantienen la matriz y las células intactas y en condiciones similares a la situación *in vivo*, sugirió que tanto las células epiteliales como mesenquimatosas contribuyen a la producción, por lo menos, del colágeno tipo III. La población celular está compuesta por células indiferenciadas en su mayoría, pero también se consiguen células comprometidas con fenotipo mesenquimático y tipo fibroblasto que expresan vimentina, la cual es una proteína de filamentos intermedios (Dobrevá y col., 2010).

Linju y colaboradores en el 2005, aislaron una población de células multipotentes provenientes del amnios humano. Estas células expresaron marcadores comunes de células madre mesenquimales, incluyendo CD105, SH-2, SH-3 y SH-4, y carecían de marcadores de células hematopoyéticas, endoteliales, y trofoblásticas. Además presentaron marcadores de superficie específico de los estadios tempranos del desarrollo como SSEA-4 y de rechazo tumoral TRA -1-60 y TRA-1-81. Lograron la diferenciación adipogénica, osteogénica, y neurogénica después del cultivo en el marco de las condiciones adecuadas.

Posteriormente en el 2007, Alviano y colaboradores obtienen una población de células madre mesenquimales multipotentes de origen fetal, provenientes del estroma de la membrana amniótica humana, encontrando que la proliferación y el potencial de diferenciación de éstas, era superior a las de las células madre mesenquimales derivadas de tejidos adultos. Las células fueron aisladas fácilmente a través de la digestión mecánica y enzimática, y mostraron morfología similar a la de los fibroblastos como suele observarse en las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Además, esta investigación reveló que la membrana amniótica es la única fuente de células madre mesenquimales que casi no posee contaminación de células no fibroblastoides, como son las hematopoyéticas y endoteliales, ya que la membrana amniótica es un tejido de sostén totalmente avascular, a diferencia de lo que se ha descrito para otros tejidos.

Díaz y colaboradores en el año 2007, aíslan dos poblaciones celulares diferentes a partir de membrana amniótica humana; una de células mesenquimatosas y la otra de células tipo epiteliales. Las células aisladas alcanzaron un 80 % de confluencia después de la semana de cultivo. Sólo una de las

poblaciones expresó la presencia de marcadores de células madre mesenquimales y sólo ésta mostró tener una mayor capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos, para lo cual emplearon, medios inductores comerciales. La diferenciación fue evidenciada mediante coloraciones histoquímicas e inmunocitoquímica, así, para la diferenciación adipogénica se usó la tinción con Aceite Rojo O, la condrogénica fue revelada con Hematoxilina/Eosina, Safranina O y con anticuerpos contra Colágeno tipo II y agregán y para la diferenciación osteogénica emplearon tinción con Rojo de Alizarina S. Además, determinaron la expresión de genes específicos para dicha diferenciación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real.

En el 2008, Marcus y colaboradores caracterizaron una población de células madre aisladas de explantes de membrana amniótica de fetos de rata. Estas expresaron marcadores de superficie CD29 y CD90, pero la expresión fue negativa para los marcadores linfohematopoyético CD45 y CD11b. Para evaluar la plasticidad, tanto los cultivos primarios como los subcultivos, fueron sometidos a una serie de condiciones de cultivo destinadas a fomentar la diferenciación en tipos celulares derivados del neuroectodermo, mesodermo y endodermo, con lo que lograron la diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica pero no la diferenciación hacia un fenotipo hepático. Las células se mantuvieron a través de los pasajes sin perder su plasticidad. Se sugiere que las células provenientes del estroma la membrana amniótica son capaces de mantener a largo plazo su capacidad de autorenovación y multidiferenciación, reuniendo las características de una población de células madre mesenquimales.

Células madre mesenquimales de membrana amniótica humana, fueron aisladas y cultivadas exitosamente por Mihu y colaboradores en el 2009. Estas células fueron obtenidas por disgregación mecánica y enzimática con tripsina-colagenasa V y su adhesión ocurrió después de los 2 días de iniciado el cultivo primario, resultando una población heterogénea, la cual se homogeneizó en subcultivos posteriores, predominando células de morfología ahusada, fibroblastoide típica. Las células aisladas, una vez lograda la adhesión y proliferación, alcanzaron un 70-80 % de confluencia después de los 10 días de cultivo, disminuyendo el tiempo de duplicación entre los subcultivos. Reportaron su capacidad clonal, estabilidad genética y la expresión de marcadores característicos de células madre, con una expresión positiva para

marcadores de Multipotencialidad, Fosfatasa Alcalina, Oct-4, SSEA-4, marcadores de células madre mesenquimales CD29 y CD105, Sox-2 y Nanog pero también revelan una expresión negativa para antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad HLA, describiéndolas como células inmunológicamente inmaduras.

En el 2010, Díaz y colaboradores nuevamente aíslan, cuantifican y caracterizan células derivadas de la membrana amniótica humana. Estas células fueron obtenidas por disgregación enzimática y posteriormente caracterizadas por citometría de flujo. Se realizaron estudios inmunofenotípicos que demostraron la expresión de marcadores comunes de células troncales de origen mesenquimal CD29, CD73, CD90, CD105 y CD166, así como marcadores de células madre embrionarias SSEA-4 y marcadores de células de origen mesenquimático Stro-1. La cuantificación se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real. De igual manera, analizan su potencial de diferenciación *in vitro* hacia linajes celulares mesodérmicos mediante coloraciones histoquímicas e inmunocitoquímica.

Además de los estudios descritos anteriormente, existen otros que señalan diferenciación hacia un fenotipo cardiomiogénico (Peng y col., 2005), neural (De Coppi y col., 2007), endotelial (Radisky y La Barge, 2008), y epitelial (Rodríguez, 2011). La membrana amniótica junto con las células obtenidas de su estroma, también han sido utilizadas en ingeniería de tejidos para el tratamiento de quemaduras, úlceras, heridas crónicas o defectos cutáneos empleándolas en la creación de equivalentes de piel viva, es decir, en la creación de vendajes quirúrgicos como sustitutos dérmicos (Yang y col., 2009). Han sido usadas en la restauración de la superficie conjuntival y ocular (Tejwani y col., 2007); así como para la reconstrucción de la cavidad oral (Rinastiti y col., 2006), vejiga y vagina; timpanoplastia (Fernandes y col., 2005) y como biomaterial para la fabricación de soportes de cultivo celular (Ferreira y col., 2007; Niknejad y col., 2008; Kim y col., 2009; Muiños, 2010; Díaz y col., 2011; Tan y col., 2011).

Actualmente, Díaz y colaboradores continúan estudiando no sólo la utilidad de la membrana amniótica como fuente de células madre mesenquimales, sino también como sustrato biológico en el tratamiento de la osteoartritis. Los modelos de reparación *in vitro* de cartilago articular humano, empleando condrocitos, células madre mesenquimales amnióticas humanas y células epiteliales amnióticas humanas

cultivadas sobre la membrana amniótica, mostraron la síntesis de un tejido de reparación fibrocartilaginoso que mostró buena integración con el tejido nativo. Además, los resultados revelan que la reparación era de mayor calidad cuando se empleaban células madre mesenquimales de la membrana amniótica, que cuando se utilizaban condrocitos humanos, sugiriendo que esta puede ser un modelo muy útil en la reparación de las lesiones y el deterioro de la integridad del cartílago hialino y hueso subcondral y en el mejoramiento de la comprensión de los eventos moleculares implicados en la condrogénesis (Muiños, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de alternativas de dónde extraer células madre sin suponer un riesgo para el donante y que se encuentren en gran cantidad, ha llevado al desarrollo de técnicas que permitan cultivar, caracterizar y diferenciar las células troncales de naturaleza mesenquimales extraídas de la membrana amniótica, la cual no acarrea problemas técnicos, éticos o morales ya que es un tejido extraembrionario de fácil acceso y manipulación, considerado como residuo clínico. El propósito actual para los investigadores es aislar células madre mesenquimales y usarlas como fuente de reparación tisular en diversos campos de la bioingeniería y terapia celular. Para esto es necesario su expansión y caracterización biológica, así como su diferenciación *in vitro* en distintos linajes.

Son pocos los estudios reportados acerca de estas células troncales y a nivel nacional no se han realizado trabajos con membrana amniótica como fuente de obtención, posiblemente debido a la limitada experiencia y recursos escasos de los laboratorios capaces de llevar a cabo estas investigaciones. Se ha propuesto contribuir con dichos estudios, ideando un protocolo fácilmente reproducible que conlleve al incremento de la efectividad de los ya existentes; todo esto con el fin de crear modelos experimentales *in vitro* que puedan ser extrapolados en seres humanos y otras especies y que permitan aumentar el conocimiento sobre la biología de estas células, llevando a la expansión de sus posibles usos en tratamientos de ciertas patologías y enfermedades degenerativas en las que la ciencia no había asomado alguna posibilidad de cura; por lo que en el presente proyecto se planteó el desarrollo de técnicas que involucran un trabajo más eficiente en cuanto al aprovechamiento del tiempo y recursos, permitiendo el establecimiento de las condiciones óptimas para el aislamiento, mantenimiento, crecimiento y caracterización de las células madre mesenquimales del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Además se comprobó la hipótesis de sí se considera que la diferenciación de estas células es influenciada por factores epigénicos, entonces brindando *in vitro* un microambiente circundante inductor suministrando diferentes condiciones de cultivo, podrían canalizarse hacia un fenotipo adiposo, cartilaginoso y óseo.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General*

Establecer cultivos de células madre mesenquimales provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón y analizar la potencialidad de diferenciación *in vitro* de estas células troncales bajo diferentes estrategias de inducción.

4.2. *Objetivos Específicos*

1. Aislar las células madre mesenquimales provenientes del estroma de la membrana amniótica y evaluar la viabilidad celular después de la disgregación enzimática.
2. Establecer cultivos en monocapa de las células madre mesenquimales aisladas y determinar las condiciones óptimas para el mantenimiento y crecimiento de estas en cultivo.
3. Caracterizar morfológica y bioquímicamente *in vitro* las células madre mesenquimales mediante técnicas de microscopía de luz, coloraciones histoquímicas y determinaciones inmunocitoquímica.
4. Ensayar métodos inductores de la diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales a un fenotipo óseo, cartilaginoso y adiposo, usando diferentes medios inductores y sistema de monocapa.
5. Evaluar la diferenciación fenotípica por medio de técnicas histoquímicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Para el establecimiento del cultivo de las células del estroma de la membrana amniótica se utilizaron fetos de ratones de entre 14-17 días de gestación, de la especie *Mus musculus*, cepa NMRI obtenidos del Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE) y del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR).

El material biológico sobrante fue descartado según los reglamentos del laboratorio.

5.2. Estudio histológico de la membrana amniótica de fetos de ratón

Membranas amnióticas con buena integridad estructural, fueron fijadas usando formalina neutra al 10% (Ver apéndice 11.2.1.) en la que se dejaron por una semana, luego de lo cual fueron deshidratadas en una batería creciente de etanol alcanzando de manera paulatina el etanol al 100%. Posteriormente fueron pasadas por tolueno el cual es una sustancia miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar y se incluyeron en parafina para ser cortadas en secciones de 5 μm . de espesor en un micrótomos rotatorio (Spencer). Los cortes obtenidos fueron colocados en portaobjeto con albúmina de Mayer (Ver apéndice 11.2.2.) y dejados a temperatura ambiente para que se secan. Por último, estos fueron desparafinados con xilol e hidratados en una batería decreciente de etanol hasta agua destilada. La caracterización histoquímica del tejido se realizó mediante la coloración de rutina, hematoxilina/eosina.

El medio de adhesión principalmente se usa para potenciar la unión de los cortes al vidrio. La Albúmina de Mayer, actúa como mordiente disminuyendo la tensión superficial al favorecer la interacción entre las cargas del portaobjeto y el tejido y aumenta la capilaridad permitiendo una mayor unión entre ambos (Montuenga y col., 2009).

5.3. Obtención y establecimiento del cultivo primario de las células del estroma de la membrana amniótica

Para la obtención de las células del estroma de la membrana amniótica, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se disectaron asépticamente en la campana de flujo laminar horizontal, haciendo una incisión media ventral seguida de un corte transversal en la piel de la línea media del abdomen. Esta se levantó y luego se separó la musculatura adyacente; exponiendo las vísceras las cuales se apartaron dejando al descubierto los fetos en los cuernos del útero, que posteriormente fueron transferidos a una placa de Petri con Solución Buffer Fosfato (PBS. Ver apéndice 11.1.1.) libre de calcio y magnesio, para realizar la extracción de las membranas amnióticas. Los fetos se liberaron de los cuernos del útero, asépticamente en la campana de flujo laminar vertical, dejándolos envueltos únicamente en su membrana amniótica; la cual se encuentra unida a su vez, a la placenta.

Las membranas amnióticas fueron retiradas; desechando la placenta y los embriones. Seguidamente se transfirieron a una placa de Petri donde fueron lavadas repetidamente en PBS para retirar los restos de sangre y se disectaron por disgregación mecánica usando tijeras finas hasta obtener secciones pequeñas de aproximadamente 2 mm. las cuales fueron sometidas a distintos tratamientos.

Las estrategias utilizadas para establecer los cultivos primarios de las células mesenquimales, fueron la del cultivo por explante y la de disgregación enzimática; siguiendo las metodologías propuestas por Marcus y colaboradores en 2008 y Mihi y colaboradores en 2009, respectivamente; con algunas modificaciones, las cuales son descritas a continuación.

5.3.1. Cultivo por explantes

El cultivo por explante consiste en la siembra en un sustrato o soporte de cultivo en una interface líquida-gaseosa, de pequeños trozos de tejido, dando como resultado la migración de células desde el fragmento. Este crecimiento irradiado, permite la obtención de zonas de monocapas que se pueden subcultivar, amplificando la población celular (Freshney, 2000).

Para el establecimiento de los cultivos por explantes fueron procesadas un total de 5 muestras de las cuales se obtuvo un promedio de 8 años por cada una.

Las secciones de tejido obtenidas se colocaron equidistantemente en placas de cultivo plásticas, estériles. Luego de que los trozos se adhirieran a la placa, se les agregó medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, GIBCO), antibióticos, aminoácidos no – esenciales (GIBCO) y piruvato de sodio (GIBCO), como fuente extra de energía (Ver apéndice 11.1.2.). De ahora en adelante, al medio de cultivo con esta composición descrita, se nombrará como medio nutritivo.

En este caso, este tipo de cultivo fue posible ya que se ha determinado que los cortes transversales de las membranas amnióticas, presentan gran cantidad de tejido conectivo, lo que permite de manera más rápida la migración y proliferación de las células. Las poblaciones celulares obtenidas fueron fijadas para caracterizaciones morfológicas e inmunocitoquímicas (Resultados no mostrados).

5.3.2. Disgregación enzimática

Consiste en la siembra en un sustrato de cultivo en una interface líquida-gaseosa, de una suspensión celular derivada de una disgregación con enzimas, dando como resultado una monocapa de células adherentes. La densidad celular que se obtiene por este método viene determinada por la superficie utilizable (inhibición del crecimiento por contacto). Su principal ventaja es la facilidad del cambio de medio sin más que verter y reponer el medio, debido a que las células permanecen adheridas al sustrato de cultivo (Freshney, 2000).

Para el establecimiento de este tipo de cultivo primario fueron procesadas 19 muestras, aislándose una densidad total de entre 400000 y 600000 cél./mL/muestra.

Las secciones de tejido obtenidas fueron incubadas con agitación con una mezcla en proporción 1:1 de las enzimas Tripsina al 0,125% (GIBCO. Ver apéndice 11.1.3.) en base de una solución PBS y Colagenasa tipo V al 0,05% (1 mg/mL, GIBCO. Ver apéndice 11.1.4.), a 37 °C durante 15 minutos. A la suspensión celular resultante se le agregó medio nutritivo para inactivar el efecto de la tripsina y se centrifugó a 724,5 g por 10 minutos. El taco celular obtenido fue resuspendido en medio nutritivo y se realizó el conteo celular para conocer cuantitativamente la densidad celular dentro del cultivo y la cantidad de células viables,

la cual fue determinada por medio del colorante de exclusión azul tripano y el uso de un hemocitómetro (BOECO). Finalmente, este fue sembrado en frascos de cultivo estériles cuya área dependió del número de células viables obtenidas, los cuales fueron pretratados con gelatina al 1% (GIBCO. Ver apéndice 11.1.5.). Numerosos estudios parecen indicar que el tratamiento de las superficies de cultivo con compuestos biológicamente activos pueden inducir alteraciones específicas en el comportamiento celular, favoreciendo la adherencia y crecimiento de las células (Freshney, 2000).

Los cultivos por explantes y los de disgregación enzimática, fueron mantenidos en una incubadora a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Cuando se trabaja con recipientes abiertos en incubadoras, se debe contar con una adecuada fase gaseosa de 95% aire - 5% CO₂ para mantener un pH de 7,2- 7,4; similar al fisiológico, óptimo para el crecimiento de la mayoría de las células (Herrero, 2004), con lo que se logra un microambiente funcional *in vitro* en el cual se mantendrá la viabilidad celular. El medio fue reemplazado periódicamente de manera aséptica en la campana de flujo laminar vertical, 1 o 2 veces por semana para así eliminar los restos de células y detritos, hasta que fuese alcanzada la semiconfluencia. Una vez que las células se multiplicaron cubriendo 80-90 % de la superficie disponible del recipiente de cultivo, en el caso de los cultivos en monocapa y en el caso de los cultivos por explantes, se observó un halo de irradiación 4 o 5 veces más grande que el explante de donde proviene; se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población celular y controlar la densidad del inóculo inicial asegurando el trabajo en condiciones óptimas de crecimiento.

5.4. Establecimiento de subcultivos

Tanto los cultivos por explantes como los cultivos en monocapa, fueron sometidos a un proceso de disgregación en una mezcla en proporción 1:1 de tripsina al 0,125% y Ácido Etilendiaminotetraacético al 0,02% (EDTA, Sigma. Ver apéndice 11.1.6.), incubándolos a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 5 minutos.

La amplificación celular se llevó a cabo en placas o frascos de cultivo, cuya área dependió del número de células viables obtenidas. El mantenimiento de los subcultivos se realizó de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para los cultivos primarios, descritas anteriormente.

Es de gran importancia recalcar que las células obtenidas de los subcultivos fueron las utilizadas posteriormente en los ensayos de proliferación y caracterización celular.

5.5. Evaluación de la eficiencia de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (UFC-F)

La evaluación de la eficiencia de unidades formadoras de colonias fibroblastoides permitió estudiar la capacidad de expansión, propagación y auto-renovación a baja densidad de las células mesenquimales en cultivo, cada una capaz de dividirse por mitosis y de originar nuevas células indiferenciadas. Todas las células agrupadas juntas conforman una colonia.

La elaboración de estos cultivos se realizó de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para el establecimiento de los cultivos por disgregación enzimática. Una vez obtenido el taco celular resuspendido en medio nutritivo, se realizaron siembras a baja densidad de la siguiente manera: Alícuotas de 500 células/mL fueron sembradas en placas de 35 mm. con medio nutritivo. Estas se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ con cambios de medio periódicos durante 14 días. Luego las células se fijaron usando metanol al 100% por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió colorante Azul de Toluidina y se dejó actuar por unos 10 minutos para crear artificialmente un contraste diferencial entre los diversos elementos y así poner de manifiesto las diferentes estructuras celulares (Resultados no mostrados).

5.6. Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación permitieron observar el crecimiento de la población de células del estroma de la membrana amniótica en condiciones *in vitro*. Asimismo, permitieron comparar la influencia de factores solubles presentes en el medio, sobre la proliferación *in vitro* de dichas células.

5.6.1. Curva de crecimiento

El crecimiento celular implica el incremento de todos los componentes de la célula, lo que se traduce en un aumento en la masa celular y posteriormente, su multiplicación. Para poder predecir la proliferación de un cultivo es importante conocer la cinética de crecimiento de éste, lo que nos permite estudiar las respuestas de la célula ante un estímulo particular. La curva de crecimiento permite corroborar el óptimo crecimiento y mantenimiento *in vitro* de las células (Sharp, 1980).

Para ello fue necesario disgregar las células incubándolas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 5 minutos en una mezcla en proporción 1:1 de tripsina al 0,125% – EDTA al 0,02%. Posteriormente se realizó el conteo en hemocitómetro utilizando el colorante de exclusión azul tripano y se utilizaron placas plásticas 6X4 como superficie de cultivo, donde fueron sembradas aproximadamente 50.000 células por pozo (células/pozo), las cuales se mantuvieron en incubadora a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂; con medio nutritivo.

Las células fueron incubadas durante 11 días, realizándose conteo celular en un hemocitómetro utilizando el colorante de exclusión azul tripano, en el 4^{to}, 7^{mo}, 9^{no} y 11^{vo} día de cultivo.

A partir de la información arrojada por el conteo en cuanto al número de células, se realizó una curva de crecimiento celular mostrando el logaritmo del número de células vivas en función del tiempo.

Además, se realizaron ensayos de la misma forma y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, usando medio nutritivo suplementado de dos maneras diferentes (Tabla 3), con el propósito de ensayar a que concentraciones de SFB se obtenía una mayor tasa de proliferación celular: una de las placas fue mantenida con medio nutritivo suplementado con 15% SFB y la otra con medio nutritivo suplementado con 20% SFB. La variación significativa del patrón de crecimiento celular entre los distintos tratamientos fue determinada por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) con un $n = 6$ y un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, donde $p < 0,05$ fueron considerados significativos; cuyos datos son representados como media y media $\pm 0,95$ (intervalo de confianza de 95%) x desviación estándar (SD). Con esta prueba se planteó la hipótesis nula de que todas las medias son iguales y por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre los patrones de crecimiento de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, en medio

de cultivo DMEM suplementado con 15% SFB y 20% SFB. La prueba estadística se realizó usando el programa Sigma Plot 7.0.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo ensayados en estudios comparativos de proliferación celular.

Medio	% Suero Fetal Bovino (SFB)	Otros Suplementos
DMEM	15 %	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 50 µg/mL de Gentamicina ➤ 100 µg/mL de Estreptomina ➤ 1 mM de Piruvato de Sodio ➤ 1 mM de Aminoácidos No Esenciales
DMEM	20 %	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 50 µg/mL de Gentamicina ➤ 100 µg/mL de Estreptomina ➤ 1 mM de Piruvato de Sodio ➤ 1 mM de Aminoácidos No Esenciales

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

5.6.2. Método del MTT

Para la determinación de la proliferación celular también se utilizó el método del MTT [3-(4,5 Dimetil, tiazol-2y1)-2,5 Bromuro de Difenil Tetrazolium] el cual se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolium soluble en agua, a un cristal insoluble de color violeta, denominado formazán, debido a la ruptura del anillo tetrazolium por la activación de las enzimas succinato deshidrogenasas de las mitocondrias activas y el cual queda atrapado en el interior de las células. Este método ha sido muy utilizado para medir cuantitativamente supervivencia y proliferación celular en forma de densidad óptica, donde la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1993 citado en Calderón, 2007).

Para llevar a cabo este método, fueron utilizadas placas plásticas 6x4 como superficie de cultivo donde se realizaron siembras a una densidad de 30.000 células/pozo; incubándose 10 días bajo las mismas

condiciones de los cultivos celulares. Al 4^{to}, 7^{mo} y 10^{mo} se retiró el medio de cultivo dejando la placa lo más seca posible y se les agregó 50 μ L por pozo (μ L/pozo) de MTT disuelto en PBS (0,4 mg/mL, Sigma), incubándolas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, el MTT fue descartado y se agregaron 100 μ L/pozo de Dimetil Sulfoxido (DMSO, Scharlav) en oscuridad, el cual es un solvente orgánico, para luego determinar la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Stat Fax – 2100 (AWARENESS Technology INC.) a una longitud de 570 nm.

El análisis estadístico para determinar e identificar las diferentes fases del comportamiento típico de las células en cultivo fue realizado mediante un ANOVA con un n = 24 y un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, donde $p < 0,05$ fueron considerados significativos; cuyos datos son representados como media y media \pm 0,95 x desviación estándar para cada tiempo de cultivo. Con esta prueba se planteó la hipótesis nula de que todas las medias son iguales y por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre las densidades ópticas a los distintos días de cultivo. La prueba estadística se realizó usando el programa Sigma Plot 7.0.

5.7. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Una vez logrado el establecimiento y el mantenimiento de los cultivos, se realizaron, entre otros; los estudios de caracterización de las células del estroma de la membrana amniótica. La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste fases y se realizaron coloraciones histológicas de rutina May Grünwald-Giemsa. Para caracterizar y evidenciar la expresión de proteínas citoesqueléticas relacionadas con células indiferenciadas de origen mesenquimático en los cultivos, se determinó mediante inmunocitoquímica la expresión de Vimentina y Stro-1. Adicionalmente, fueron realizadas determinaciones del antígeno H2, molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Es preciso mencionar que para llevar a cabo las caracterizaciones, fue necesario realizar cultivos en frascos especiales que poseen una laminilla en su interior donde se adhieren las células, denominados Tubos de Leighton. Para cada subcultivo celular, fueron preparadas diluciones con el medio nutritivo, sembrando

30.000 células por tubo (células/tubo), los cuales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, hasta que se alcanzó la semiconfluencia.

5.7.1. Observaciones periódicas al microscopio

Las observaciones al microscopio permiten el estudio sobre células vivas. Se empleó un microscopio invertido de contraste fases Olympus IX50 cuyo principio funcional se fundamenta en una interacción entre la luz que difractan las células por las estructuras ópticamente densas de la muestra, los rayos que atraviesan áreas menos densas y las diferencias en los índices de refracción que se convierten en diferencias de amplitud que el ojo puede detectar.

Este a su vez, se encuentra acoplado a una computadora con la cual se tomaron los registros, digitalizando la imagen observada, usando el programa TV TURNER.

5.7.2. Coloración histológica de rutina May Grünwald-Giemsa

La Coloración May Grünwald-Giemsa también denominada como Panóptico de Pappenheim, es una técnica que consiste en una combinación de dos coloraciones sucesivas, la de May Grünwald en base a eosina y posteriormente la de Giemsa en base a azul de metileno, ambos colorantes neutros. Es muy sensible al pH, de manera que estructuras celulares con carácter básico fijan los colorantes ácidos (eosina), mientras que las que poseen carácter ácido fijan los colorantes básicos (azul de metileno), por lo cual tiñe diferencialmente el citoplasma y el núcleo celular (Urbaneja y col., 1975; García y col., 2006).

El primer paso de la coloración fue fijar las células que crecían sobre la superficie de cultivo con metanol 100% por 5 minutos. Posteriormente se añadió el colorante May Grünwald (MERCK) y se dejó actuar por unos 5 minutos. Luego fue lavado el exceso y se colocó colorante Giemsa (MERCK), previamente filtrado y diluido en proporción 1:18 con agua destilada, por 20 minutos. Por último, las muestras fueron deshidratadas sumergiéndola rápidamente, bajo la campana de extracción, en una batería de deshidratación acetona-xilol (1:0, 2:1, 1:2 y 0:1). Finalmente se dejó en xilol de 3-5 minutos, para después realizar el montaje permanente en un medio resinoso (Entellan, MERCK) (Urbaneja y col., 1975).

5.7.3. Determinación inmunocitoquímica contra Vimentina, Stro-1 y H2.

La determinación inmunocitoquímica consiste en la detección y localización de antígenos (Ag) *in situ* (cortes de tejido, extensiones celulares e incluso pequeños organismos u órganos *in toto*) utilizando anticuerpos (Ac) que reconocen específicamente ese antígeno (Montuenga y col., 2009).

Para llevar a cabo la determinación antigénica se empleó el protocolo estándar del sistema inmunocitoquímico universal SC-2050 Santa Cruz Biotechnology, el cual realiza una coloración indirecta (método indirecto). En este caso el marcaje se realizó con enzimas usando el método LSAB (Marcaje Estreptavidina-Biotina). La Estreptavidina a su vez se encuentra conjugada a peroxidasa. La presencia de gran cantidad de biotina unida al anticuerpo secundario hace que, se puedan unir un gran número de complejos estreptavidina-peroxidasa, amplificando la señal (Montuenga y col., 2009). La interacción del complejo biotina - estreptavidina - peroxidasa con el sustrato para peroxidasa, el cromógeno Diaminobencidina (DAB), junto con la activación enzimática y la oxidación del cromógeno, producirá una reacción visible por precipitación de éste, en el sitio donde esté presente el antígeno (Morel y col., 2000).

Para determinar la presencia de Vimentina en las células, se usó como marcador específico a un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra vimentina humana (mouse monoclonal antihuman vimentin, dilución 1:100), la cual es una proteína de filamentos intermedios tipo III expresada en el citoplasma de las células de origen mesenquimal.

Las muestras fueron fijadas con metanol 100% por 5 minutos y luego se incubaron por 10 minutos con solución de Peróxido de Hidrógeno al 3%. Antes de agregar el reactivo portador de la peroxidasa, es necesario incubar con peróxido de hidrógeno, agente bloqueante de la peroxidasa endógena; para evitar la peroxidación posterior del sustrato por ésta (Morel y col., 2000). Transcurrido el tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se incubaron por 2 horas con un buffer que contiene el anticuerpo primario a ensayar. Se lavó con PBS, descartando el exceso para incubar por 30 minutos con una solución que contiene el anticuerpo secundario biotinilado y posteriormente fueron lavadas nuevamente con PBS para incubar por 15 minutos con una solución Estreptavidina – Biotina – Peroxidasa HRP. Para evidenciar la reacción, se lavó con PBS y se incubó durante 30 minutos con una solución diluida de sustrato para la peroxidasa (0,05 mL por

cada mL de PBS). Finalmente, las muestras fueron lavadas con agua desionizada, contrastadas con hematoxilina y deshidratadas para luego realizar el montaje en un medio resinoso, como fue descrito anteriormente.

Stro-1 ha sido identificado como un antígeno específico para células indiferenciadas de origen mesenquimático. Es un glicoproteína que se expresa en el desarrollo temprano de dichas células, declinando su expresión en presencia de genes asociados a la diferenciación (Díaz y col., 2010). Se usó como marcador específico a un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-stro-1 humano (mouse monoclonal antihuman stro-1, dilución 1:100).

Por otra parte, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad son moléculas (polisacáridos y proteínas) que se encuentran en los glóbulos blancos (leucocitos) de la sangre y en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo (Jaime, 2001). Cumplen con la función de reconocer lo propio de lo ajeno y aseguran la respuesta inmune (Rus y col., 2005; Flores y col., 2006). En el ratón se denominan antígenos H2. Las células madre embrionarias son células indiferenciadas que no presentan todos estos antígenos (Mercé, 2009). En particular, las células madre mesenquimales de la membrana amniótica, se caracterizan por su inmadurez inmunológica y como consecuencia, no expresan antígenos de histocompatibilidad. Se usó como marcador específico a un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-H2 de ratón (mouse monoclonal antimouse H2, dilución 1:100).

Para evidenciar la presencia tanto de Stro-1 como de H2, se procedió de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para la determinación con vimentina.

Como control negativo se usaron muestras procesadas mediante el protocolo estándar del sistema inmunocitoquímico universal SC-2050 Santa Cruz Biotechnology sin añadir el anticuerpo primario, por lo que no se obtuvo marcaje y las células se apreciaron únicamente coloreadas con hematoxilina, ya que ésta es utilizada para contrastar los ensayos inmunocitoquímicos y de no haber expresión del antígeno de interés, sólo se observaría la tinción ocasionada por ella. Se empleó una escala subjetiva, utilizando estas muestras como valor mínimo, definido por ningún signo positivo. En las determinaciones del antígeno H2, como control positivo se utilizaron muestras de fibroblastos de ratón.

5.8. Ensayos de inducción a la diferenciación en cultivos en monocapa

La población homogénea de células con morfología fusiforme obtenidas del cultivo primario, fue sembrada en cultivos en monocapa siguiendo el procedimiento que se describe a continuación y repitiéndolo para cada condición a ensayar. Este sistema de cultivo, permite brindar a las células el microambiente circundante inductivo de la expresión de características de un fenotipo diferenciado.

Luego de realizar un conteo de células viables se realizaron 4 suspensiones diluidas, sembrando con medio nutritivo en placas de 35 mm., una densidad de 55.000 células/placa y dejando transcurrir unas 24 horas para que las células se adhirieran al sustrato plástico. Posteriormente, el medio nutritivo fue extraído y se agregó el medio control y los medios a ensayar: el medio de inducción condrogénica, el medio de inducción osteogénica y el medio de inducción adipogénica, cuya composición se muestra en la tabla 4 (Ver apéndice 11.1.8.).

Tabla 4. Factores solubles ensayados en el medio base para inducir la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de las células mesenquimales del estroma de la membrana amniótica, sembradas en sistemas de cultivo en monocapa.

Diferenciación Celular	Medio de Cultivo	% Suero Fetal Bovino (SFB)	Otros Suplementos
Control	DMEM	10% SFB	<ul style="list-style-type: none">➤ 50 µg/mL de Gentamicina➤ 100 µg/mL de Estreptomina➤ 1 mM de Piruvato de Sodio➤ 1 mM de Aminoácidos No Esenciales
Osteogénica	Medio Control	10% SFB	<ul style="list-style-type: none">➤ 5 µg/mL de Insulina Recombinante➤ 50 µg/mL de Ácido Ascórbico➤ 1×10^{-7} M de Dexametasona➤ 10 mM de β-Glicerolfosfato
Condrogénica	Medio Control	10% SFB	<ul style="list-style-type: none">➤ 5 µg/mL de Insulina Recombinante➤ 50 µg/mL de Ácido Ascórbico➤ 1×10^{-7} M de Dexametasona
Adipogénica	Medio Control	10% SFB	<ul style="list-style-type: none">➤ 10 µg/mL de Insulina Recombinante➤ 1 µM de Dexametasona➤ 0,5 mM de Isobutimetilxantina➤ 200 µM de Indometacina

Estas placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 2-4 semanas, con cambios periódicos de medios. Transcurrido el tiempo de inducción, las placas se fijaron con metanol 100% para los cultivos controles y de inducción osteogénica y condrogénica y con formalina 10% para los cultivos de inducción adipogénica; finalmente se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes.

5.9. Evaluación histoquímica de la diferenciación celular

Con el fin de observar cambios morfológicos que ocurrieron durante la diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales de la membrana amniótica de ratón, se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases, tomándose registros fotográficos digitales. Además, se realizaron coloraciones histoquímicas (Ver apéndice 11.3.) que evidenciaron la diferenciación fenotípica y bioquímica de estas células, como se describe a continuación.

El **Rojo de Alizarina S** es un colorante que evidencia la presencia de depósitos de fosfatos de calcio, propios de las primeras etapas de mineralización de la matriz extracelular ósea por medio de la coloración de los mismos con una tonalidad rojo intenso o naranja. Las muestras fueron lavadas rápidamente con agua destilada y sometidas por 10 minutos a una solución de Rojo de Alizarina S al 2% a la que previamente se le ajustó el pH a un rango de 4,1 – 4,3, observando al microscopio el nivel de coloración. Al producirse la reacción, se realizaron sucesivos lavados con PBS para eliminar el exceso de colorante (Rodríguez, 2005).

La **Safranina O** es un colorante que pone en manifiesto los glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados presentes en la matriz extracelular cartilaginosa los cual se evidenciaron por medio de una coloración roja intensa. Estos se encuentran normalmente en el tejido nativo, formando agregán (Blanco y col., 2007). Las muestras se sometieron por 7 minutos a una solución previamente filtrada de Hematoxilina, luego de lo cual fueron lavadas con agua corriente; seguido se agregó por 3 minutos el colorante Fast Green al 0,001%. Se extrajo el colorante y se agregó ácido acético al 1% por 15 segundos y por último se adicionó la solución de Safranina O al 0,1% por 5 minutos la cual fue lavada con agua corriente (Prophet y col., 1995).

El Fast Green es un colorante que permite evidenciar las fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular cartilaginosa por medio de una coloración verde pálida, proporcionando una información más

detallada sobre su estructura y su composición (Blanco y col., 2007). La Hematoxilina es un colorante básico, el cual tiñe fundamentalmente estructuras celulares de carácter ácido, permitiendo contrastar los núcleos por medio de una coloración violeta, al unirse esta a los grupos fosfato (aniónicos) de los ácidos nucleicos (García y col., 2006).

El **Azul de Toluidina** es un colorante que pone en manifiesto la presencia de residuos aniónicos de tipo sulfato, propios de los proteoglicanos (PGs) ácidos sulfatados, presentes en la matriz extracelular del cartílago joven mediante una coloración púrpura; gracias a la capacidad metacromática de este (Montuenga y col., 2009). Las muestras se sometieron a agua destilada y luego se cubrieron con solución de Azul de Toluidina al 0,1%, dejando actuar el colorante por 10 minutos. Al producirse la reacción, se realizaron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

El **Azul Alcian** es un colorante que permite visualizar la presencia de glicosaminoglicanos ácidos carboxilados, propios de la matriz extracelular cartilaginosa, los cuales se tiñen de azul. Las muestras se lavaron con solución de ácido acético al 3% por 3 minutos. Fueron coloreadas con Azul Alcian pH 2,5 durante 40 minutos. Transcurrido el tiempo se contrastaron los núcleos con Hematoxilina de Mayer, dejando actuar a este por 30 segundos. Se lavó por 5 minutos con agua corriente y con agua destilada para eliminar el exceso de colorante (Lev y Spicer, 1964).

El **Sudan III** es un colorante que permite evidenciar la presencia de adipocitos coloreando las vacuolas lipídicas que aparecen durante la diferenciación, con una tonalidad rojo o naranja. Las muestras fueron incubadas en etanol al 70% por 10 minutos y coloreadas con Sudan III al 0,2% por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se lavó con etanol al 70% y con agua destilada. Los núcleos se contrastaron con Hematoxilina por 5 minutos y por último se lavó por 10 minutos con agua corriente (Martínez y Gragera, 2008).

6. RESULTADOS

6.1. Estudio histológico de la membrana amniótica de fetos de ratón

La membrana amniótica se examinó histológicamente utilizando la tinción hematoxilina/eosina (Figura 7A), técnica que nos permitió realizar un análisis microscópico de las estructuras de la misma (Figura 7B).

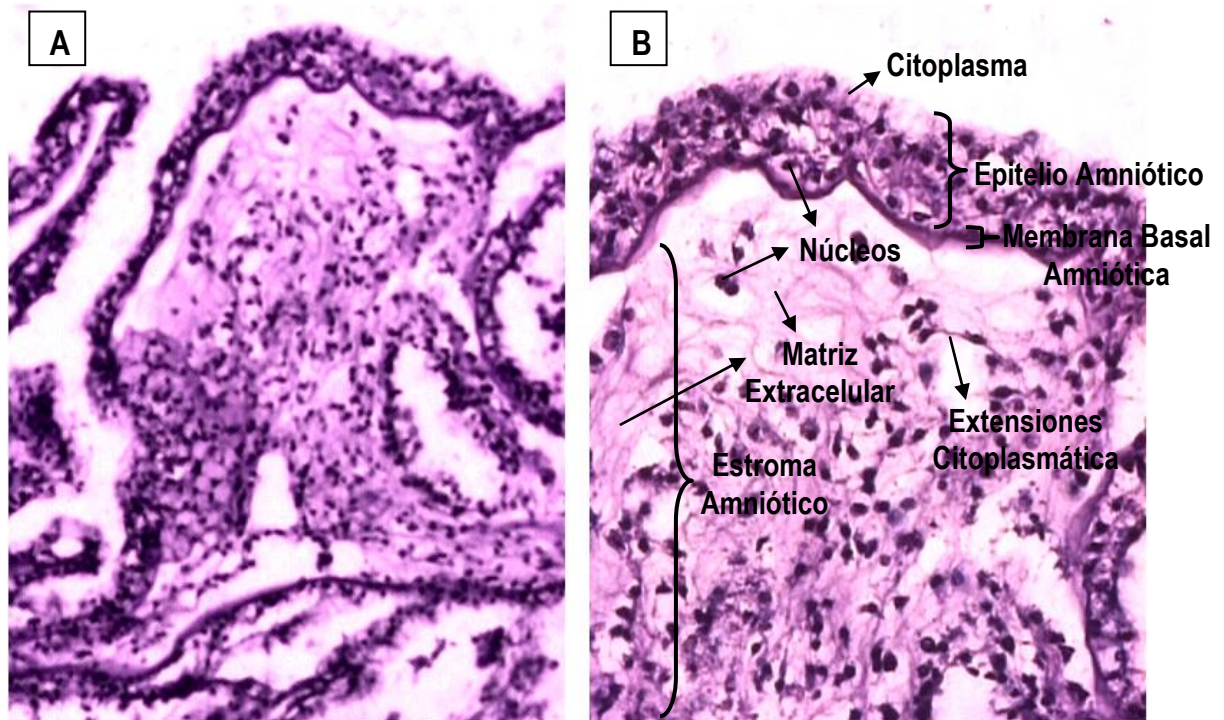


Figura 7. Corte longitudinal de la membrana amniótica de fetos de ratón tratada con la técnica de coloración hematoxilina/eosina. **A:** Corte histológico 100X. **B:** Corte histológico 200X. Se detalla la estructura del amnios como sistema de multicapas.

Se observa como el amnios está formado por una única capa ininterrumpida de epitelio, constituido por células cúbicas de las cuales se distingue un citoplasma medianamente basófilo con núcleos esféricos intensamente basófilos. Este se extiende sobre la membrana basal gruesa y continua que presenta una tonalidad intensamente basófila. A su vez, dicha membrana se encuentra adherida a la capa estromal, cuyo grosor puede variar no sólo entre individuos, sino también entre los diferentes estadios gestacionales. En ella se aprecian extensiones citoplasmáticas levemente basófilas al igual que núcleos esféricos intensamente basófilos, pertenecientes a las células que la conforman, las cuales corresponden predominantemente a células fibroblastoides; estas se encuentran inmersas en una matriz extracelular secretada por ellas mismas.

El material extracelular es el responsable de las propiedades físicas de este tejido. Está compuesto por una matriz orgánica denominada sustancia fundamental, llamada así por su aspecto semifluido la cual se distingue por una coloración levemente basófila; en el seno de esta sustancia se observan haces de fibras con tinción basófila, otro de los componentes esenciales de la matriz extracelular.

6.2. Establecimiento de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

El cultivo primario se estableció de manera eficaz utilizando tanto, la técnica del explante como la técnica de disgregación enzimática, demostrando así que las células retienen su capacidad proliferativa después de la disección, disgregación mecánica e incluso después de ser sometidas a acción enzimática.

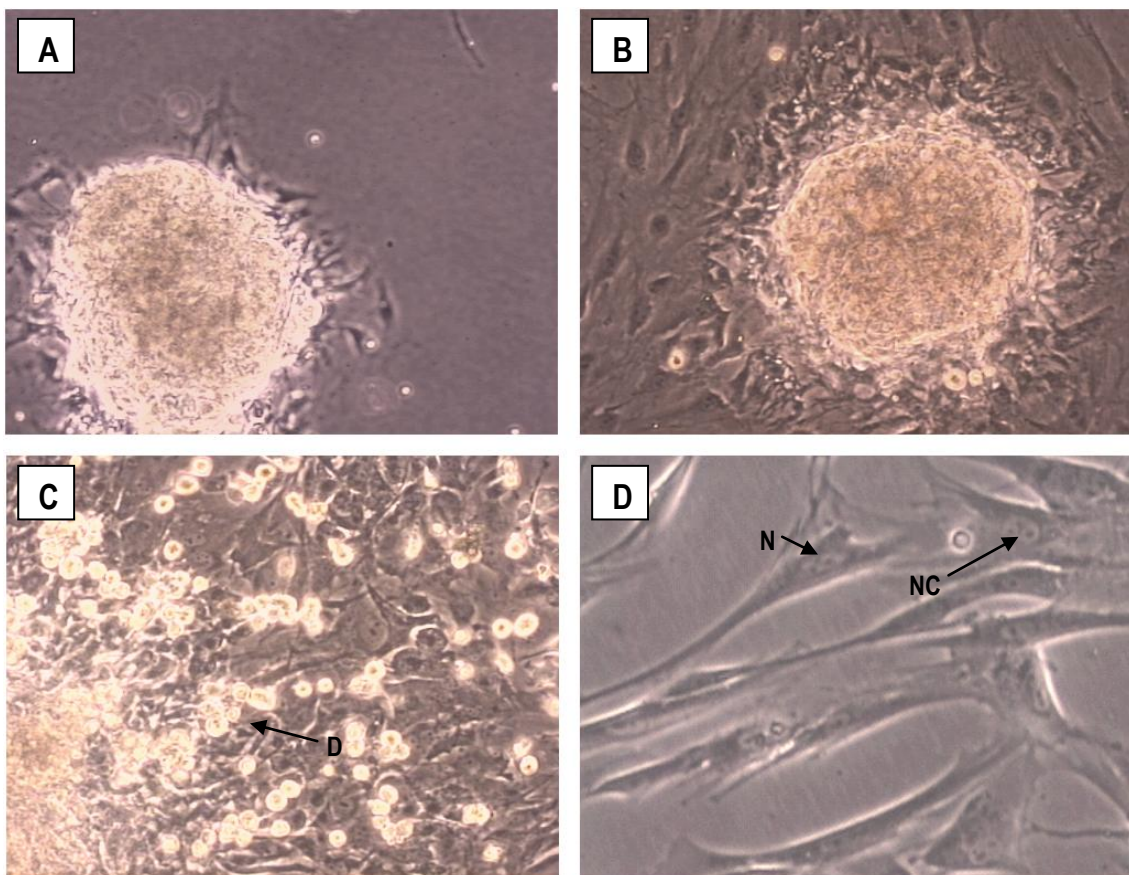


Figura 8. Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, aisladas a partir de explantes. Contraste de fase. 100X. **A:** Cultivo de 5 días. **B:** Cultivo de 12 días. **C:** Cultivo de 20 días. Se observan halos de irradiación de distinta extensión en su mayoría conformado por células con morfología fusiforme y numerosas células refringentes en división (**D**). **D:** Detalle de las células ahusadas que irradian a partir de los explantes. Contraste de fase, 400X. Puede apreciarse el núcleo (**N**) ovalado y central, con múltiples nucléolos (**NC**).

Los explantes fueron establecidos a partir de trozos de tejido tomados a continuación de someter a las membranas amnióticas a un proceso de disgregación mecánica (Figura 8), obteniéndose una irradiación positiva a partir de estos.

Los cultivos se caracterizaron por presentar en los primeros días un halo de crecimiento, donde las células proliferaban a partir del trozo de tejido sembrado (Figuras 8A y 8B). Aproximadamente, a los 21 días desde el establecimiento del cultivo se formó una monocapa confluyente de células con un fenotipo ahusado en su gran mayoría (Figuras 8C y 8D).

Al analizar los aspectos morfológicos y el comportamiento *in vitro* de los cultivos en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón obtenidos por disgregación enzimática, se pudo apreciar en las etapas iniciales, 2 tipos principales de fenotipos celulares (Figura 9) y en escasa proporción, un 3^{er} fenotipo, los cuales fueron evidenciados con microscopía de contraste de fases.

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

- ✓ Una población de células con morfología fusiforme tipo fibroblasto (Figura 9A), con un núcleo ovalado y central, múltiples nucléolos y delgadas prolongaciones citoplasmáticas, las cuales formaron en los cultivos primarios colonias homogéneas fibroblastoides, aunque este resultado fue variable. Por sus características, estas células son consideradas las células troncales mesenquimales (CPM).
- ✓ Una población de células con amplio volumen citoplasmático (células de citoplasma ancho) (Figura 9B), con núcleos ovalados excéntricos y múltiples nucléolos.
- ✓ Una población de células con morfología cuboidal o poligonal (Figura 9C), núcleos esféricos y múltiples nucléolos; que crecían en empalizada al igual que las células de los epitelios. Este tipo células es enmascarado rápidamente a medida que transcurren los días de cultivo.

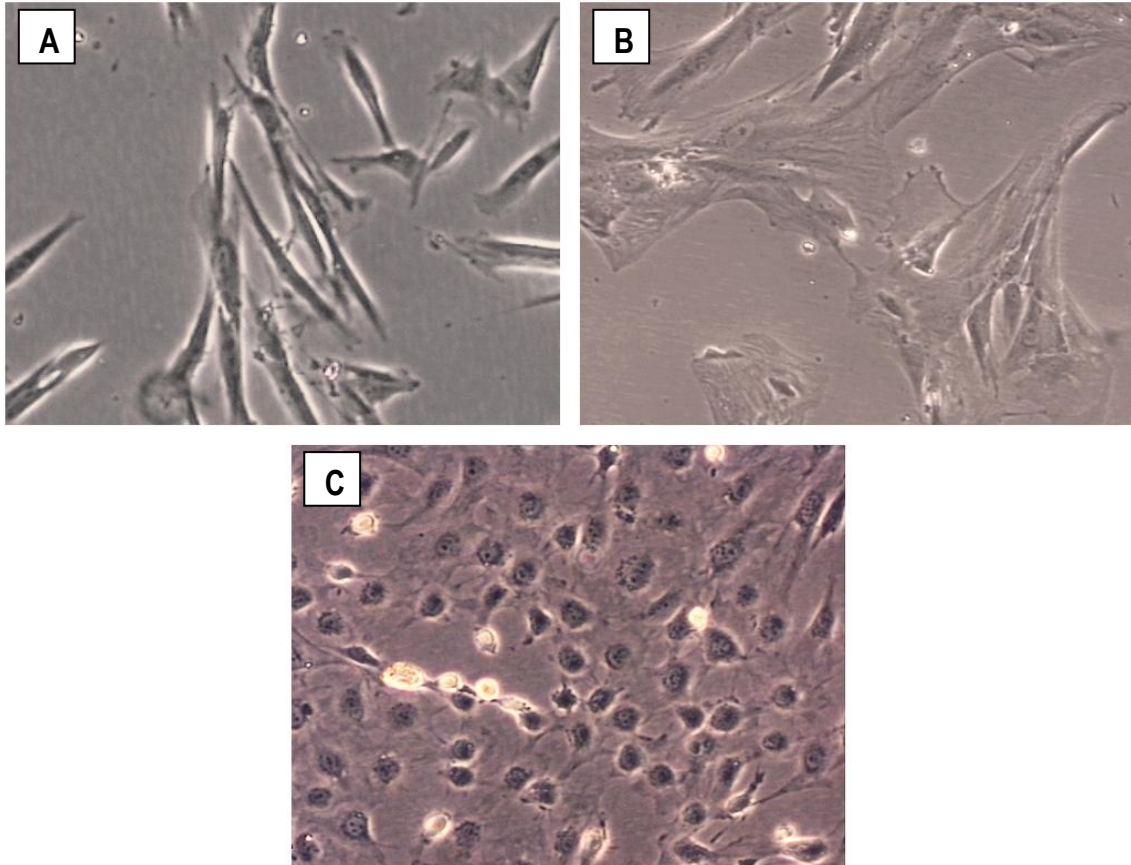


Figura 9. Poblaciones celulares obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 2 días de cultivo primario. Contraste de fase, 100X. **A:** Población de células con morfología fusiforme. **B:** Población de células con amplio volumen citoplasmático. **C:** Población de células con morfología cuboidal que se observa en muy baja proporción y es desplazada casi en su totalidad, desde las etapas iniciales de los cultivos primarios.

Las condiciones brindadas a las células cultivadas en monocapa, permitieron la proliferación y mantenimiento a mediano plazo de células fusiformes y de citoplasma ancho del estroma de la membrana amniótica (Figura 10). Desde la etapa inicial de los cultivos primarios, se apreció que las células con morfología fusiforme, proliferaron rápidamente bajo las condiciones *in vitro* suministradas lográndose mantenerlas hasta el 3^{er} pasaje, conservando su fenotipo fibroblastoide sin mostrar características morfológicas asociadas a senescencia.

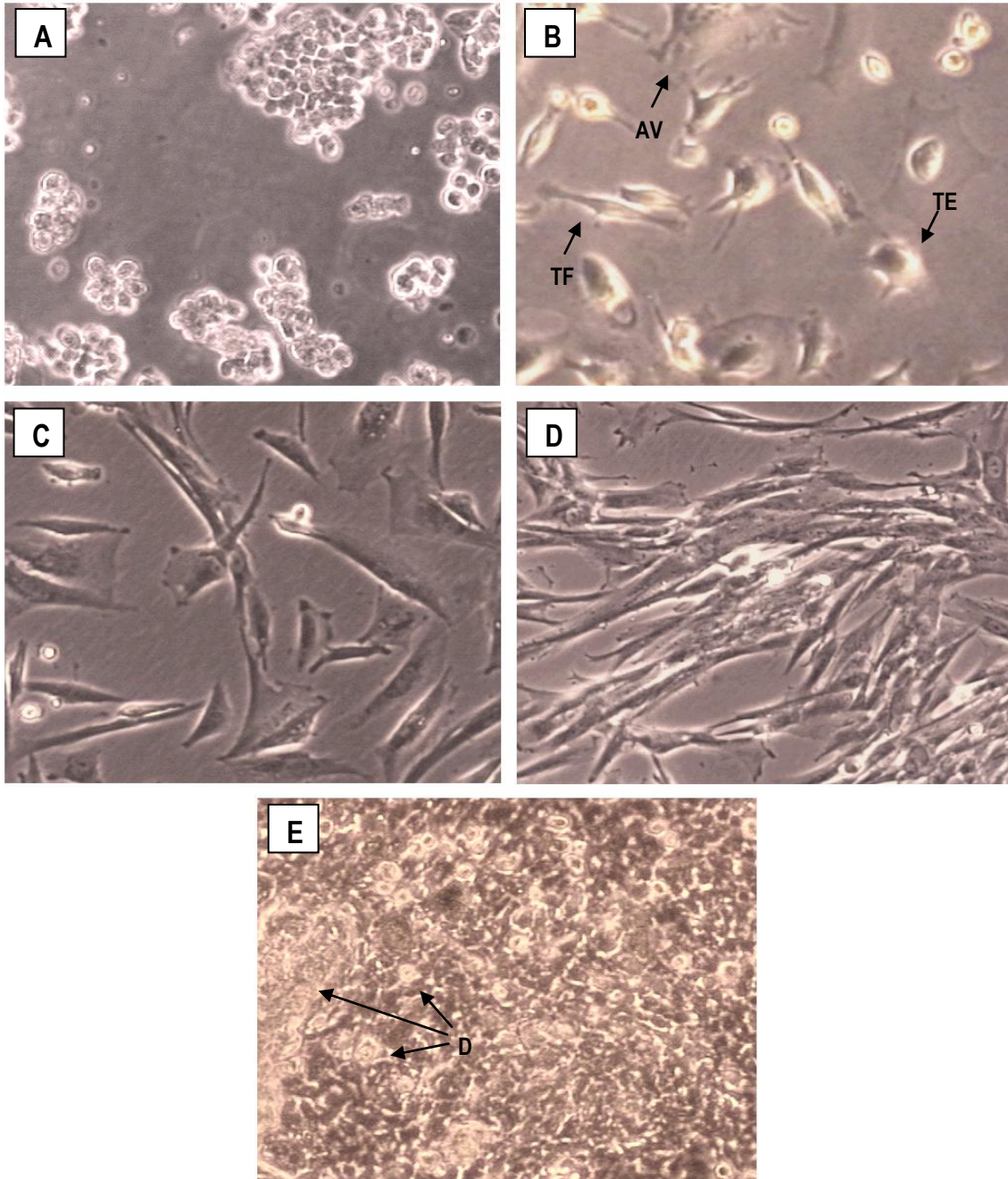


Figura 10. Secuencia del cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Contraste de fase. 100X. **A:** Día del establecimiento de cultivo. Se observan las células en suspensión formando algunos agregados. **B:** Cultivo de 1 días. Se puede apreciar una población heterogénea de células tipo fibroblastos (TF) y células tipo epiteliales (TE); en su mayoría formada por células con morfología fusiforme. También se observan células con amplio volumen citoplasmático (AV). **C:** Cultivo de 4 días. **D:** Cultivo de 6 días. Se aprecia el aumento en la población de células fusiformes. **E:** Cultivo de 9 días. Los cultivos celulares han alcanzado la confluencia. Se observan numerosas células en mitosis (D).

6.3. Amplificación de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

La confluencia de los cultivos se alcanzó generalmente entre los 7 y 9 días después de haber sido establecidos, luego de lo cual se procedió a realizar los subcultivos en los cuales se apreció una disminución

de la heterogeneidad celular, evidenciado mediante el incremento en el número de células con morfología fusiforme y la disminución de la población de células con amplio volumen citoplasmático conforme los cultivos alcanzaban la semiconfluencia (Figuras 11A, 11B y 11C).

De las poblaciones subcultivadas, todas mostraron una adecuada proliferación lográndose su desarrollo óptimo, además del mantenimiento de la viabilidad y la estimulación del crecimiento a lo largo de 3 pasajes. En la figura 11D se presenta el detalle de una célula perteneciente a un cultivo en el cual se encontraban en muy baja proporción, células que poseían características morfológicas asociadas a senescencia, caracterizadas por un citoplasma aumentado de tamaño y vacuolado.

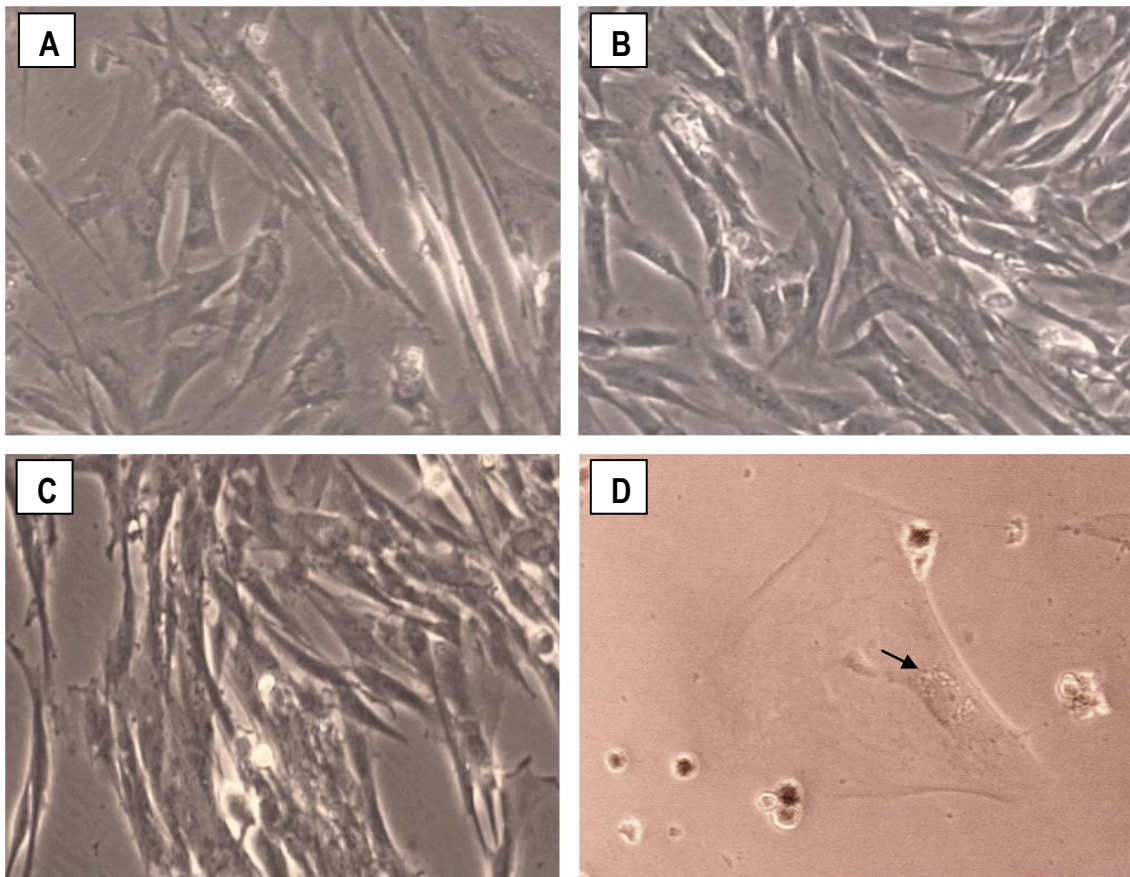


Figura 11. Subcultivos en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Contraste de fase, 100X. **A:** 1^{er} subcultivo, 6 días de cultivo. **B:** 2^{do} subcultivo, 6 días de cultivo. **C:** 3^{er} subcultivo, 6 días de cultivo. A medida que se realizaron los sucesivos pasajes e incrementó la densidad celular, se evidenció el aumento en el número de células con morfología fusiforme. **D:** 3^{er} subcultivo, 10 días de cultivo. Detalle de una célula que se encuentra senescente, en la cual se observan vacuolas citoplasmáticas (Flecha) rodeando al núcleo.

Es importante destacar la presencia de numerosas células en división que se identifican por los rebordes citoplasmáticos refringentes, tanto en los cultivos primarios obtenidos por explante y disgregación

enzimática evidenciado en la figura 8C y 10E como en los subcultivos; lo que implica un estado viable. De todas las muestras procesadas se logró obtener las células de interés a partir de todas ellas; es decir, la eficiencia de aislamiento fue de un 100%.

6.4. Determinación de la proliferación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Los ensayos de proliferación permitieron observar y estudiar la respuesta de crecimiento de las células cultivadas en medio nutritivo con diferentes concentraciones de SFB.

En general, se observó gracias a la curva de crecimiento que estas células presentaron desde el cuarto día de establecido del cultivo primario una fase de crecimiento celular, alcanzando una proliferación máxima en el noveno día (Figura 12). A partir de este punto, se aprecia el establecimiento de una fase estacionaria caracterizada por una disminución sostenida del crecimiento poblacional, sin llegar a ser evidente una fase de muerte celular.

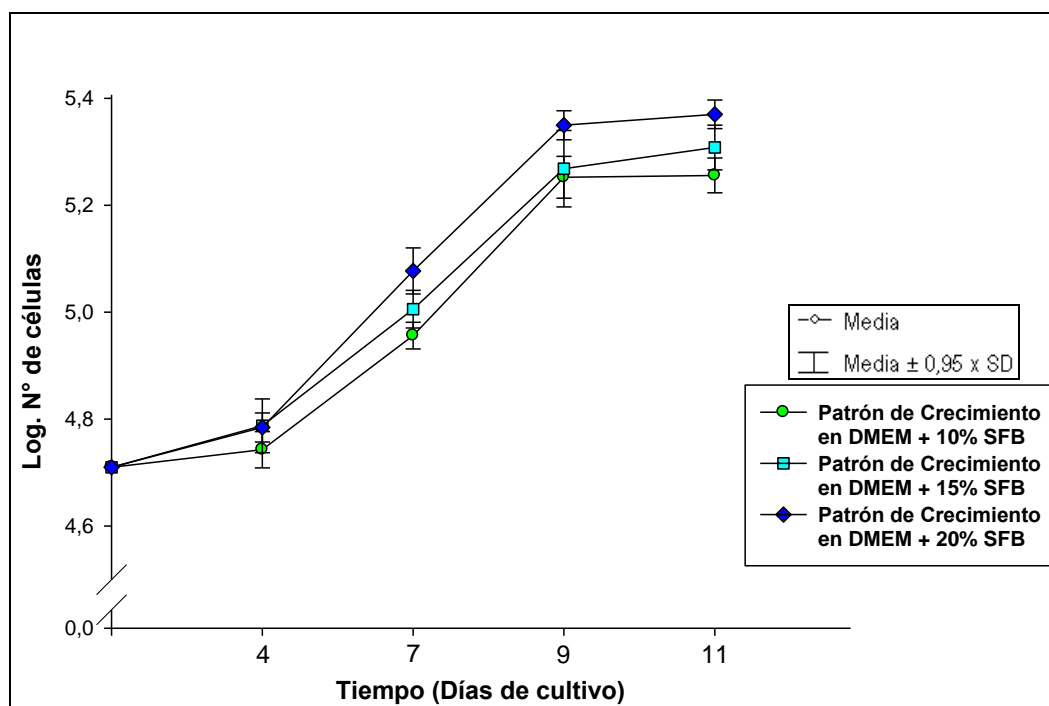


Figura 12. Comparación del patrón de crecimiento de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, en medio de cultivo DMEM suplementado con diferentes concentraciones de SFB. En los tres casos, los cultivos mostraron un desarrollo caracterizado por tres fases. Se aprecia el comienzo de la fase exponencial a los 4 días de cultivo.

Aunque las células cultivadas con 20% SFB, mostraron ligeramente una mayor proliferación con respecto a las células cultivadas con 15% SFB, y estas a su vez, con respecto a las células cultivadas con 10% SFB; mediante un análisis de varianza (ANOVA) se determinó que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los patrones de crecimiento de las células ($p=0,937>0.05$), aceptándose la hipótesis nula de que el comportamiento de las células bajo estas condiciones, es similar. Partiendo de esta premisa, en este trabajo se decidió utilizar como medio base al DMEM suplementado con 10% SFB.

También se estimó el patrón de crecimiento de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica determinando la densidad óptica registrada en los cultivos en el transcurso del tiempo mediante el ensayo del MTT (Resultados no mostrados), donde el aumento de la misma, está relacionado con el aumento de la población celular y a su vez, con el aumento en la proporción de células viables. De igual manera, se pudo observar una fase de crecimiento exponencial la cual comienza a los 4 días de cultivo. En general, estas células no presentaron una marcada fase de adaptación debido a que las condiciones de cultivo previas fueron mantenidas para este ensayo, cultivando las células en su medio nutritivo inicial.

Se determinó que estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los puntos de la curva ($p=0,0001064<0.05$), rechazándose la hipótesis nula, lo que demuestra que al menos una de las densidades ópticas es diferente a las demás. Esta diferencia estadística se apreció al 4^{to} día de cultivo, concordando con el comienzo de la fase de crecimiento exponencial.

Las células fueron expandidas mediante sucesivos ciclos de tripsinización y cultivadas durante 9 días aproximadamente por 3 pasajes, sin mostrar en general, cambios visibles en términos de morfología y/o patrones de crecimiento.

Las células individuales con morfología fusiforme sembradas a baja densidad, compatibles con células troncales mesenquimales se observaron mediante microscopía invertida (Figura 13); estas formaron colonias similares a las Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides.

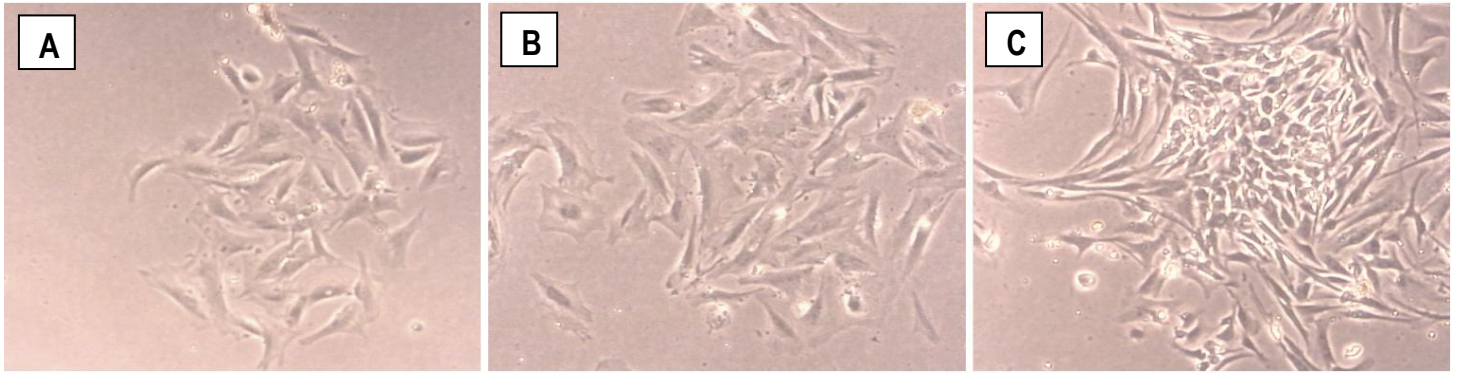


Figura 13. UFC-F de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Contraste de fase. 100X. **A:** Cultivo primario, 2 días de cultivo. **B:** Cultivo primario, 4 días de cultivo. **C:** Cultivo primario, 7 días de cultivo. Las células se dispusieron en colonias aisladas, observándose un incremento en el número de células a medida que transcurrían los días de cultivo y las cuales posteriormente formaron una zona de monocapa.

6.5. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Una vez logrado el establecimiento y el mantenimiento de los cultivos, se realizaron, entre otros; los estudios de caracterización morfológica e inmunocitoquímica.

Al evaluar las características morfológicas con coloraciones de rutina May Grünwald-Giemsa de las células provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón en los cultivos en monocapa, se observó que estos presentaban básicamente 2 tipos celulares (Figura 14), esto es, células tipo fibroblastos (TF) y células de citoplasma ancho (AV), predominando las primeras a medida que avanzaban los días de cultivo pero sin dejar de estar presente las segundas.

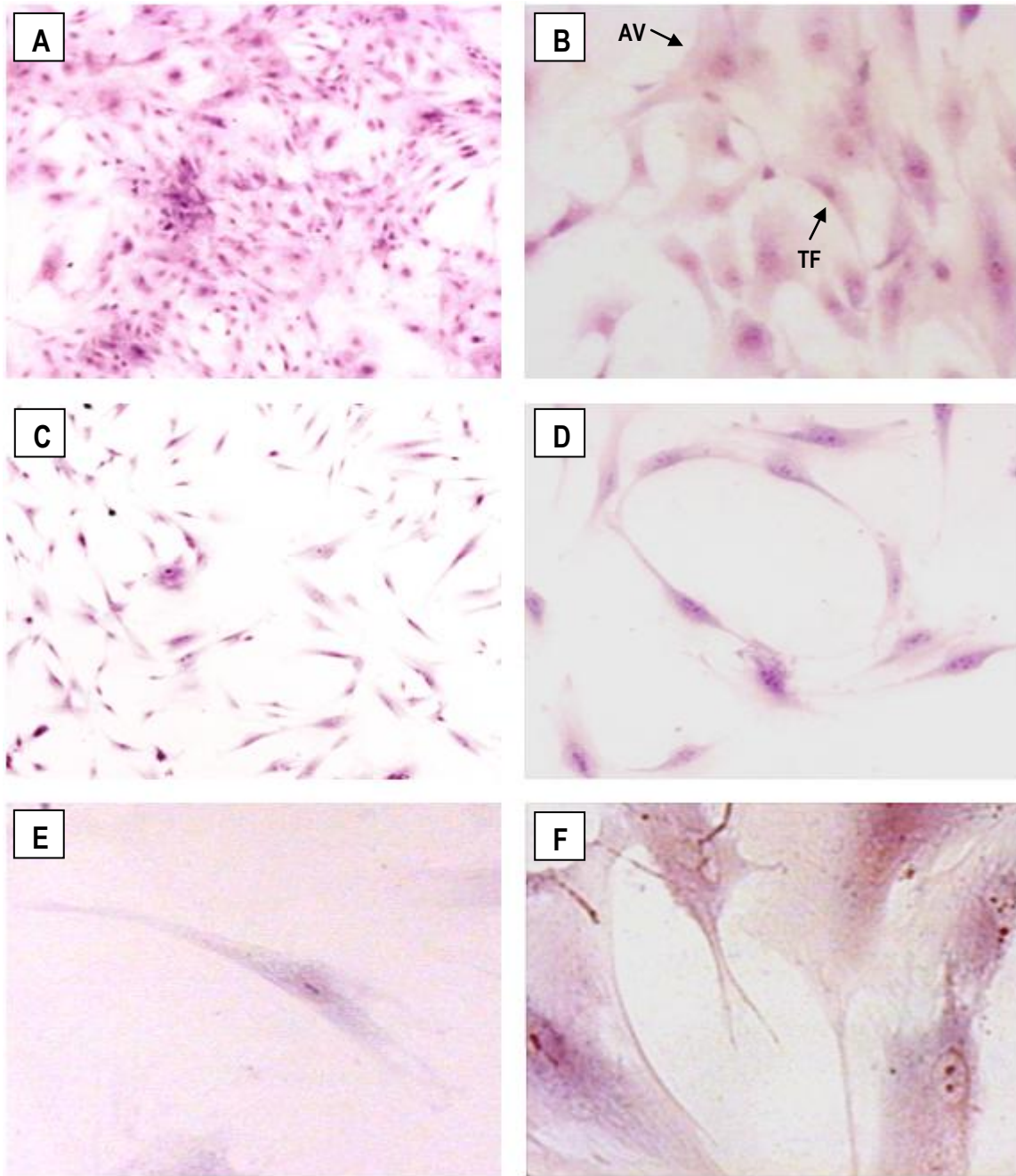


Figura 14. Coloración May Grünwald-Giemsa de cultivos primarios y subcultivos en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de ratón. **A:** Cultivo primario, 7 días de cultivo. 40X. **B:** Cultivo primario, 7 días de cultivo. 100X. En sentido general, se observa una población constituida en su mayoría por células con morfología fusiforme, tipo fibroblastos (TF). También se observan algunas células con amplio volumen citoplasmático (AV). **C:** 2^{do} subcultivo, 7 días de cultivo. 40X. **D:** 2^{do} subcultivo, 7 días de cultivo. 100X. A medida que se realizaron los subcultivos, fue evidente el aumento en el número de células con morfología ahusada. **E:** Detalle de una célula adherente de morfología fibroblastoide típica. 400X. **F:** Detalle de células con amplio volumen citoplasmático. 400X.

También se pudo apreciar en escasa proporción, un 3^{er} fenotipo celular caracterizado por una población de células con morfología cuboidal o poligonal, similares a células epiteliales (Resultados no mostrados). Como ya se mencionó anteriormente, estas son desplazadas casi en su totalidad, desde las etapas iniciales de los cultivos primarios.

Las células de principal interés en este trabajo, son las células tipo fibroblastos. En general, estas células anclaje dependientes, forman colonias y exhiben morfología fusiforme con citoplasma ahusado basófilo, núcleos ovalados, prominentes, con levemente basófila localizados en la región más engrosada del citoplasma y en cuyo interior se encuentran nucléolos con tinción intensamente basófila (Figura 14E). Estas, por sus características morfológicas posiblemente correspondan a células madre de naturaleza mesenquimal.

Las células de amplio volumen citoplasmático poseen una morfología indefinida (Figura 14F) y presentan una coloración citoplasmática basófila con núcleos esféricos, excéntricos y levemente basófilos y nucléolos intensamente basófilos.

La caracterización inmunocitoquímica de estas células se realizó mediante un inmunomarcaje de las proteínas Vimentina, Stro-1 y H2. El revelado del marcate fue realizado con una solución de Diaminobencidina (DAB) al 0,05%; este cromógeno se oxida y forma un precipitado marrón e insoluble, por lo que las células que resultan positivas para la expresión, presentaron una coloración parda que determina la ubicación de la proteína de interés dentro de la célula.

Este ensayo se realizó en cultivo primario y en un 2^{do} subcultivo. Los dos tipos celulares persistentes mostraron expresión positiva tanto de Vimentina como de Stro-1, en distintas intensidades. En general, el nivel de expresión de ambas proteínas se mantuvo constante tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos. Estas a su vez, no mostraron expresión de H2 (Figura 15); característica propia de las células madre mesenquimales provenientes de tejido embrionario o extraembrionario, las cuales por su inmadurez inmunológica, no expresan antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

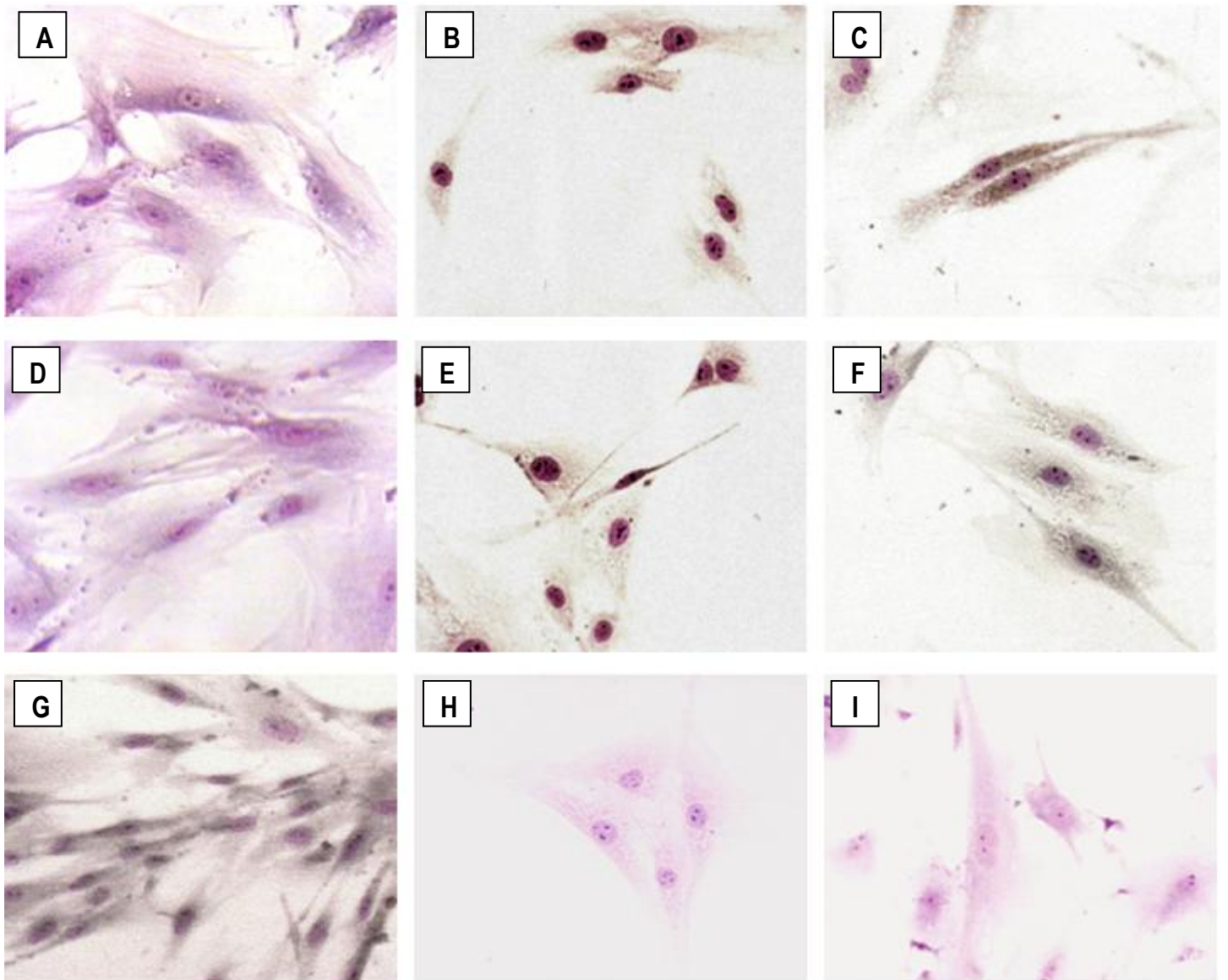


Figura 15. Evaluación inmunocitoquímica de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. Controles negativos. 100X. **A:** Sin anticuerpo en contra de Vimentina. **D:** Sin anticuerpo en contra de Stro-1. **G:** Sin anticuerpo en contra de H2. Cultivos primarios, 8 días de cultivo. 100X. **B:** Anticuerpo en contra de Vimentina. **E:** Anticuerpo en contra de Stro-1. **H:** Anticuerpo en contra de H2. Segundo subcultivo, 8 días de cultivo. 100X. **C:** Anticuerpo en contra de Vimentina. **F:** Anticuerpo en contra de Stro-1. **I:** Anticuerpo en contra de H2. En general, tanto en la determinación contra Vimentina como en la de Stro-1 se puede observar células fusiformes y de amplio volumen citoplasmático con coloración citoplasmática parduzca, positivas a la determinación. En el caso del anticuerpo en contra de H2, no se aprecia coloración citoplasmática parduzca, indicando que la determinación fue negativa

En la tabla 5, se resumen los resultados subjetivos para la caracterización inmunocitoquímica de las monocapas de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. El porcentaje de células positivas a estas determinaciones se mantuvo constante tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos sugiriendo que la intensidad y cantidad de células marcadas prevalece a medida que aumenta el tiempo del cultivo.

La inmunocitoquímica en contra del antígeno Vimentina y Stro-1, permitió corroborar el mantenimiento de la naturaleza mesenquimal de estas células en cultivo, incluso después de los diferentes subcultivos.

Tabla 5. Resumen de las evaluaciones de la diferencia en la intensidad del marcaje inmunocitoquímico de las monocapas de las células obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. ++ = Marcaje fuertemente positivo; + = Marcaje Positivo; - = Marcaje Negativo.

Determinación Inmunocitoquímica	Cultivos Control	Cultivo Primario	2 ^{do} Subcultivo
Vimentina	-	++	++
Stro-1	-	++	++
H2	-	-	-

6.6. Evaluación morfológica e histoquímica de la inducción de la diferenciación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Para observar los cambios morfológicos en los cultivos en monocapa se realizaron observaciones al microscopio de contraste de fases y se determinó además la expresión de rasgos característicos de los linajes de interés (Figura 16). Los resultados obtenidos fueron dependientes de los suplementos y compuestos considerados inductores de la diferenciación presentes en los medios ensayados.

En los cultivos mantenidos en medio de diferenciación osteogénico se apreció la formación de nódulos celulares a partir de la 1^{era} semana de inducción, los cuales se forman por unión de las células a continuación de la formación de una monocapa, de igual manera se observaron cambios morfológicos en las células que migraban de estos agregados, caracterizados por la pérdida de su morfología ahusada característica inicial, presentando ahora una forma celular estrellada con menor número de prolongaciones citoplasmáticas y de menor tamaño en comparación con las células de morfología fibroblastoide de los cultivos control (Figura 16B); consistente con la morfología osteoblástica.

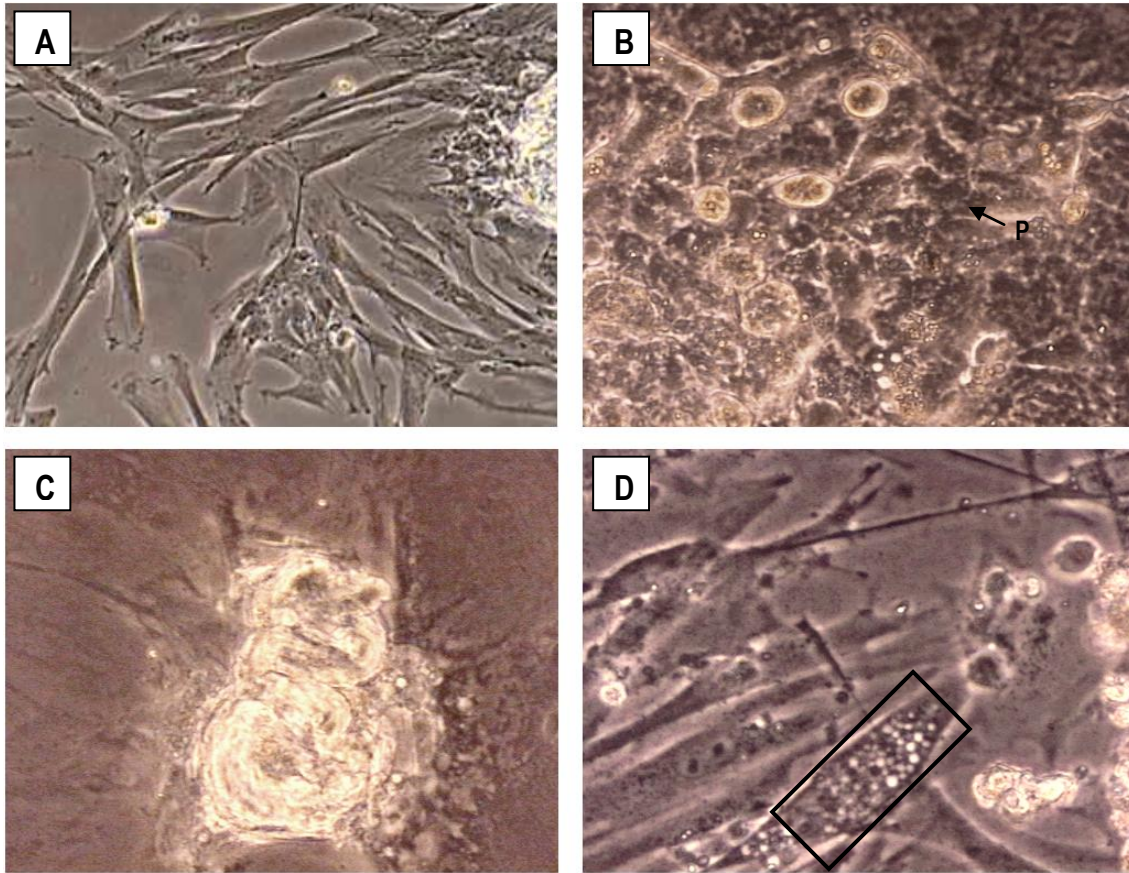


Figura 16. Cultivo primario en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón a los 8 días de inducción. **A:** Cultivo control. Contraste de fase, 200X. Monocapa de células cultivadas en medio control donde no se observa cambios morfológicos aparentes. **B:** Cultivo mantenido en medio de diferenciación osteogénico. Contraste de fase, 200X. Se puede observar la formación de varias capas de células donde estas presentan una morfología similar a poligonal (P). **C:** Cultivo mantenido en medio de diferenciación condrogénico. Contraste de fase, 200X. Las células se agruparon formando agregados. **D:** Cultivo mantenido en medio de diferenciación adipogénico en el cual se aprecia en baja proporción células ahusadas con vacuolas citoplasmáticas refringentes (Recuadro). Contraste de fases, 400X. En general, obsérvese la expresión de rasgos característicos de los linajes de interés, dependiendo del medio ensayado.

Dicha diferenciación se evaluó histológicamente mediante la coloración con Rojo Alizarina S para la cual se observó un marcaje positivo en distintas intensidades de tinción que iba desde naranja hasta rojo, en todos los cultivos (Figuras 17B y 17C); sugiriendo mineralización temprana de la matriz extracelular al detectar presencia diferencial de sales de calcio depositadas. Este marcaje positivo sólo fue apreciado en los agregados celulares formados, en aquellos en formación y en las células que irradiaban de estos pero no en las células aisladas, sugiriendo la capacidad de estas de sintetizar componentes osteogénicos de matriz extracelular.

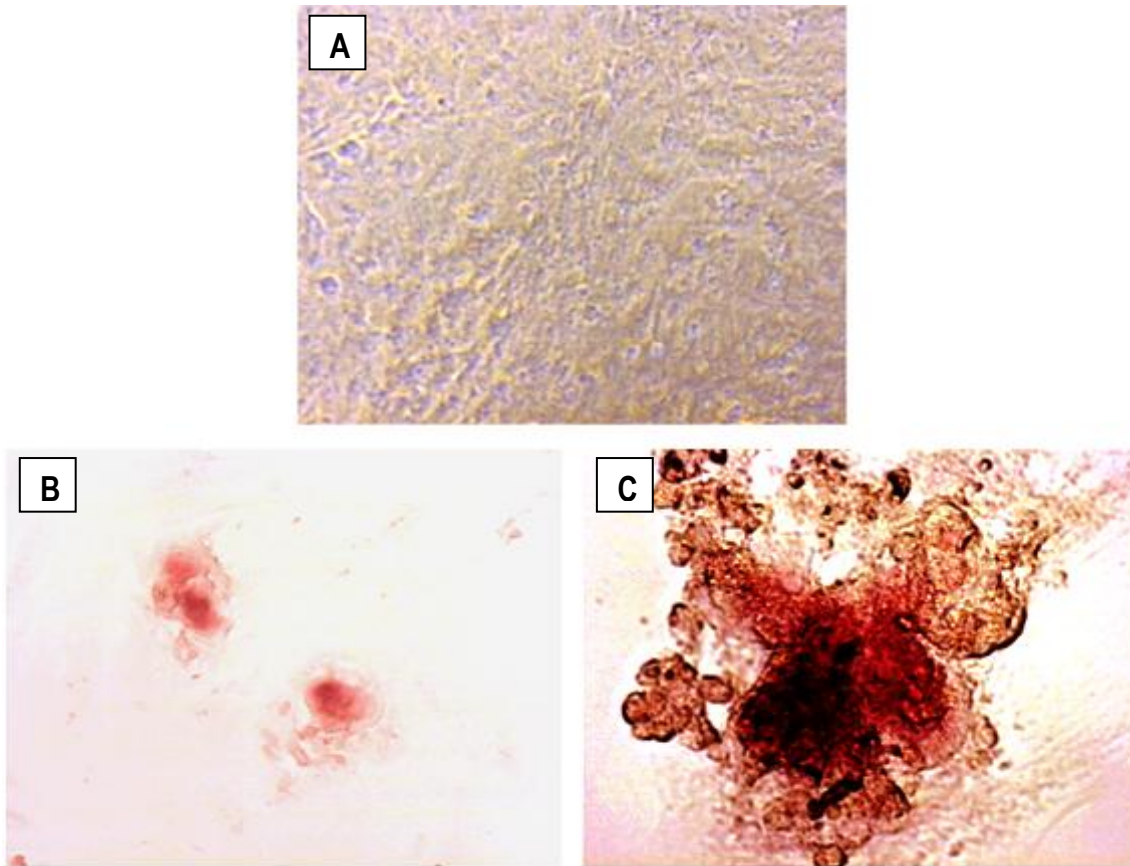


Figura 17. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación osteogénica en monocapa con Rojo Alizarina S de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 14 días de inducción. **A:** Cultivo control. 100X. Monocapa confluyente de células cultivadas en medio control, la cual resulta negativa a la coloración. **B:** Estructuras nodulares con marcaje positivo. 40X. **C:** Estructura nodular con marcaje positivo. 400X. Se observan zonas positivas con distinta intensidad de tinción rojiza, evidenciando la presencia en menor o mayor grado, de depósitos de fosfatos de calcio característicos de las primeras etapas de mineralización de la matriz extracelular.

Además, las células obtenidas a partir del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón fueron inducidas a la diferenciación hacia un linaje condrogénico; durante este tiempo, las células en presencia de los factores de diferenciación mostraron cambios morfológicos a partir de la 1^{era} semana de inducción, pasando de una morfología fusiforme a una configuración redondeada y disminuida de tamaño (Resultados no mostrados). Estas células se agruparon formando estructuras nodulares (Figura 16C) las cuales presentaron un marcaje positivo en distintas intensidades a las determinaciones histoquímicas empleadas para la evaluación de dicha inducción, sugiriendo la capacidad de estas de sintetizar componentes condrogénicos de matriz extracelular.

La coloración con Safranina O permitió demostrar la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados, componentes de la matriz extracelular cartilaginosa, los cuales se evidenciaron por medio de una coloración

rojiza moderada (Figura 18B y 18C), tanto en los nódulos completamente formados como en los nódulos en formación.

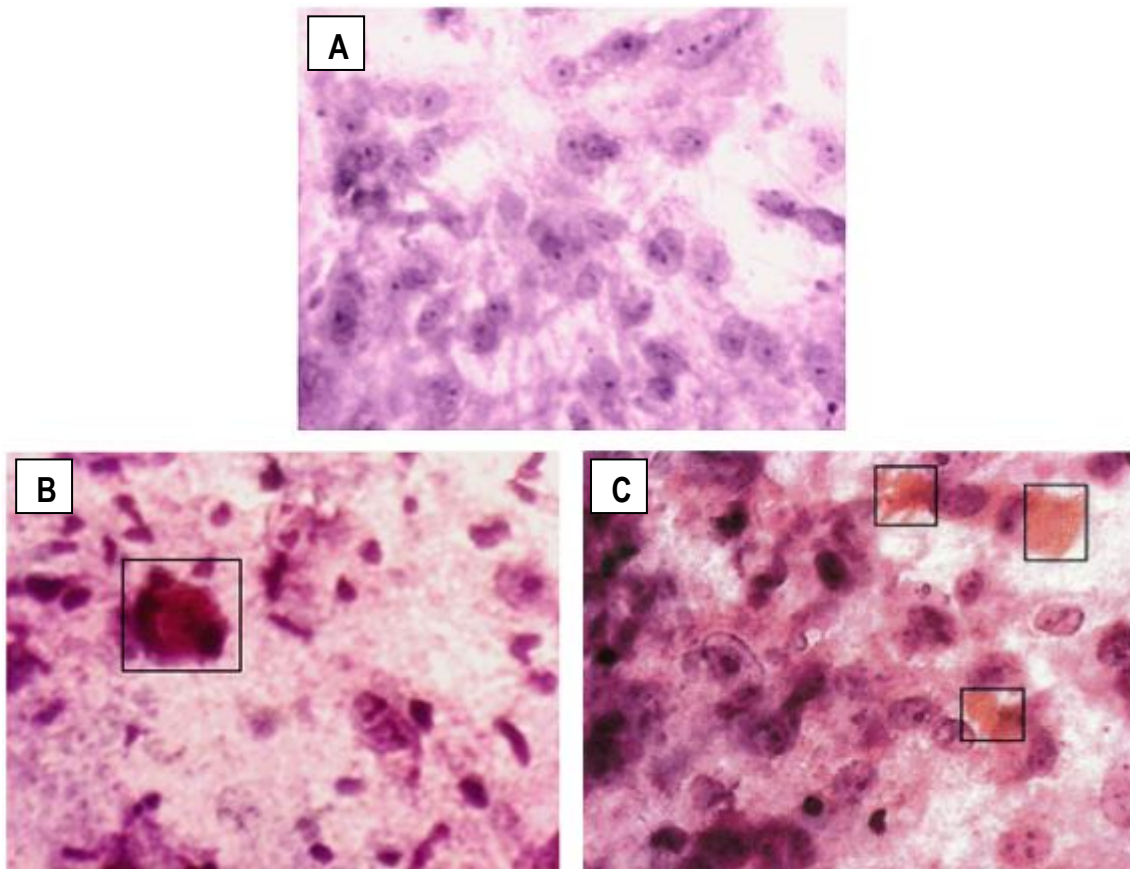


Figura 18. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Safranina O de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 14 días de inducción. **A:** Cultivo control. 200X. Monocapa de células cultivadas en medio control las cuales resultan negativas a la coloración. **B:** Agregado celular con marcaje intensamente positivo. **C:** Nódulos en formación con marcaje débilmente positivo. 200X. Se observan nódulos (Recuadros) con distinta intensidad de tinción rojiza, lo que detecta presencia diferencial de glicosaminoglicanos sulfatados.

La coloración con Azul de Toluidina reveló además un claro aumento en la metacromásia, evidenciando la presencia de residuos aniónicos de tipo sulfato propios de los proteoglicanos ácidos sulfatados presentes en la matriz extracelular cartilaginosa en formación, los cuales se tiñeron intensamente de púrpura (Figuras 19B y 19C).

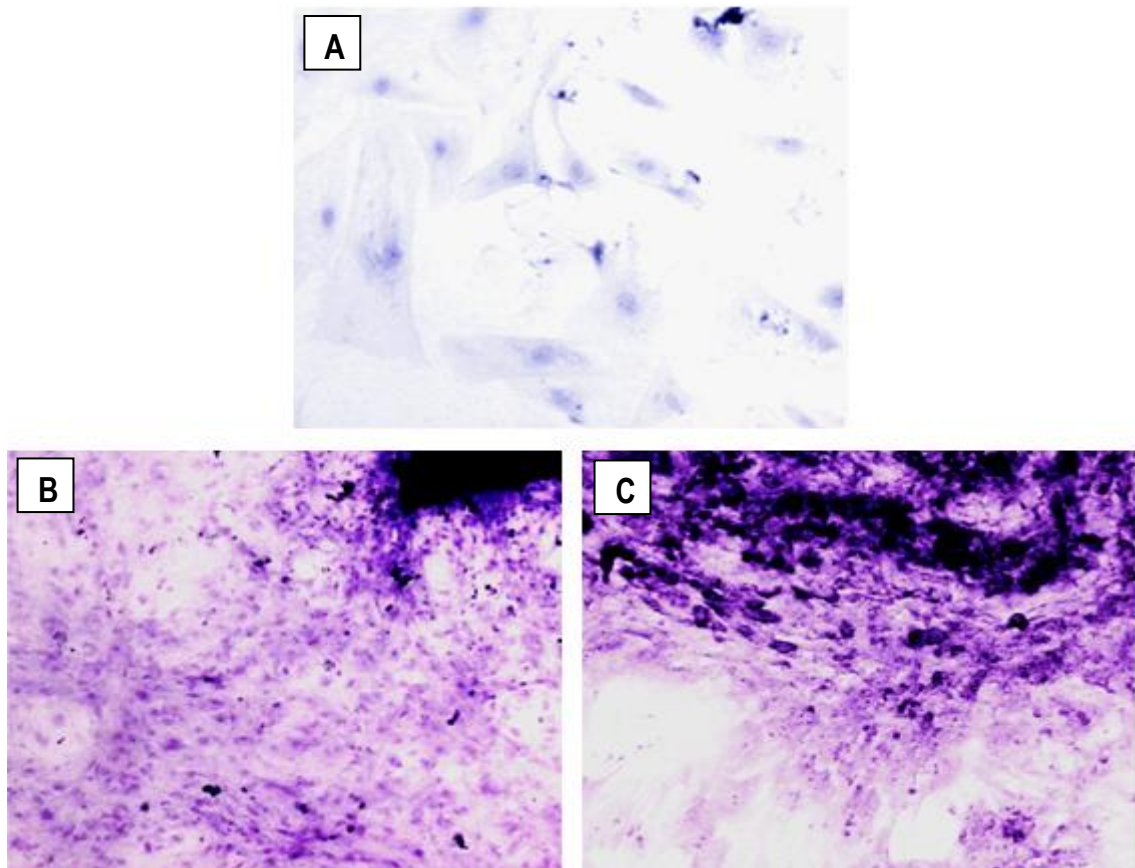


Figura 19. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Azul de Toluidina de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 14 días de inducción. **A:** Cultivo control. 100X. Monocapa de células cultivadas en medio control donde se observa una población constituida en su mayoría por células con morfología fusiforme las cuales resultan negativas a la coloración. **B:** Estructura nodular con marcaje positivo. 40X. Gracias a la capacidad metacromática de este colorante, se pone en manifiesto la existencia de proteoglicanos ácidos sulfatados, presentes en la matriz extracelular cartilaginosa mediante una coloración rojo púrpura. **C:** Agregado celular con marcaje positivo. 100X. La coloración sólo se apreció en los nódulos formados y en aquellos en formación pero no en las células que migraban de dichos agregados.

También se realizó la coloración Azul Alcian pH 2,5 que permitió la identificación positiva mediante una coloración intensa dada principalmente por el color azul (Figuras 20B y 20C), de glicosaminoglicanos ácidos carboxilados, componentes principales presentes en la matriz extracelular cartilaginosa.

A nivel general, en todos los cultivos tanto en la inducción osteogénica como en la condrogénica, se observó variación en la cantidad y tamaño de los nódulos celulares formados, sin apreciarse un patrón específico; así para los cultivos sometidos a inducción condrogénica se observaron nódulos de gran tamaño y en escasa proporción y pequeños y en mayor proporción para la inducción osteogénica. De igual manera, los nódulos formados presentaron marcaje más intenso que los que se encontraban en formación.

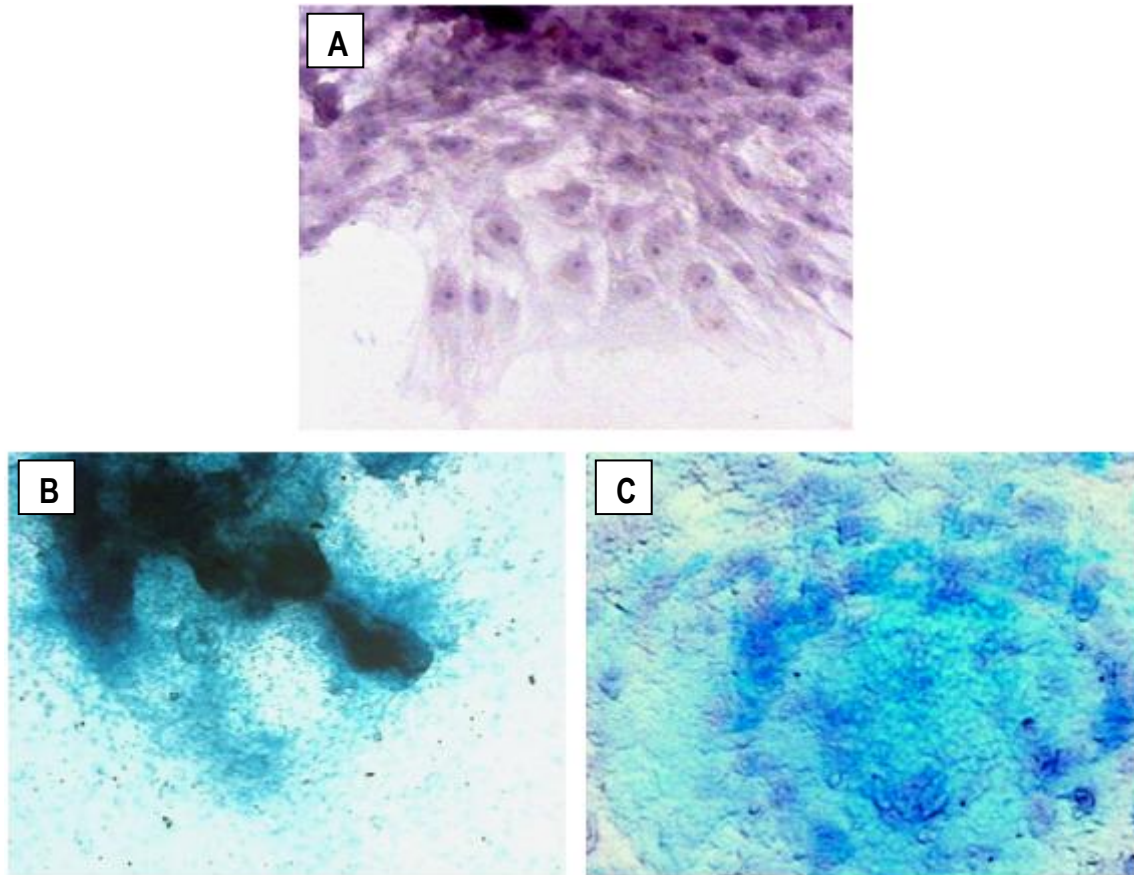


Figura 20. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación condrogénica en monocapa con Azul Alcian de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 14 días de inducción. **A:** Cultivo control. 200X. Monocapa de células cultivadas en medio control donde se observa una población constituida en su mayoría por células con morfología fusiforme las cuales resultan negativas a la coloración. **B:** Estructura nodular con marcaje intensamente positivo del cual irradian regiones con marcaje más leve. 40X. **C:** Zona de la monocapa con marcaje positivo. 100X. Patrón de distribución de los glicosaminoglicanos ácidos sulfatados identificados mediante una coloración azul, que se encuentran en algunas regiones de la monocapa y en la zona central del nódulo celular.

En cuanto a los cultivos mantenidos en medio de diferenciación adipogénico, se reporta la visualización de múltiples vacuolas citoplasmáticas a partir del 8^{vo} día de cultivo bajo los efectos de los factores solubles (Figura 16D), observándose pequeñas inclusiones citoplasmáticas refringentes que rodean al núcleo, las cuales se hicieron más frecuentes y prominentes a medida que transcurrieron los días de cultivo. No se apreció cambio morfológico aparente en las células diferenciadas, aunque estas sólo se obtuvieron en un bajo porcentaje; conservando su morfología fibroblastoide, sugiriendo la presencia de células con características de adipocitos inmaduros multiloculares. La gran cantidad de vacuolas, observadas estructuralmente no se evidenciaron a nivel microscópico al realizar la prueba histoquímica pero las células presentaron un marcaje citoplasmático moderadamente positivo (Figura 21A), al igual que las inclusiones presentes en las monocapas (Figura 21B); al ser teñidas de rojo con el Sudan III, indicando la presencia de lípidos o grasas neutras en ellas.

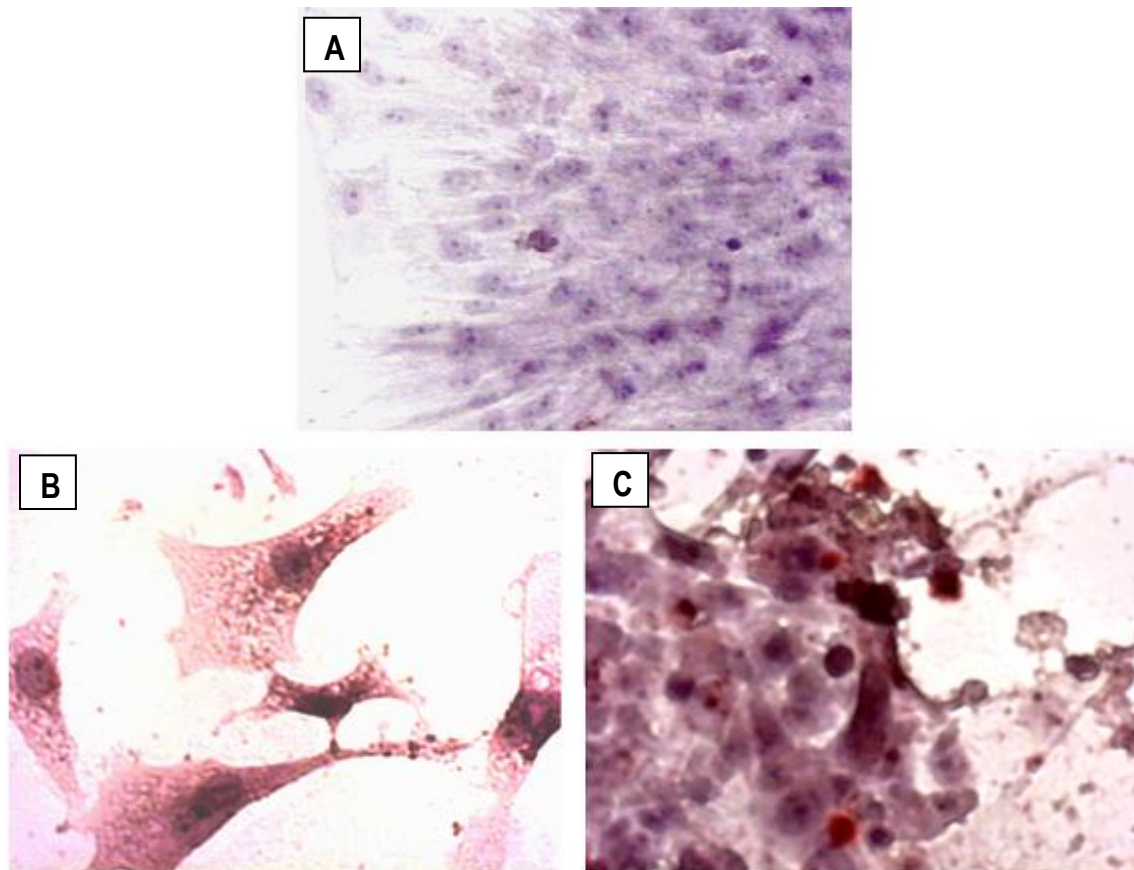


Figura 21. Evaluación histoquímica de los ensayos de diferenciación adipogénica en monocapa con Sudan III de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón. 14 días de inducción. **A:** Cultivo control. 200X. Monocapa semiconfluyente de células cultivadas en medio control cuya mayoría corresponde a células con morfología fusiforme las cuales resultan negativas a la coloración. **B:** Células con marcaje citoplasmático moderadamente positivo. **C:** Inclusiones con marcaje moderadamente positivo. 200X. Las estructuras que presentan tinción rojiza, evidencian la presencia de lípidos.

Al evaluar la diferenciación de las células mantenidas en cultivo en medio nutritivo sin añadir factores solubles inductores (cultivos control), no se observaron cambios morfológicos aparentes apreciándose una morfología celular homogénea, donde se encontró mayoritariamente células fusiformes con núcleos ovalados y prominentes (Figura 16A). A medida que transcurrían los días, estas formaron una monocapa confluyente que de igual manera, no presento cambios relevantes. Las coloraciones realizadas a estas células resultaron negativas, indicando la ausencia de matriz extracelular mineralizada, proteoglicanos ácidos sulfatados, glicosaminoglicanos sulfatados y carboxilados y vacuolas lipídicas (Figuras 17A, 18A, 19A, 20A y 21A), producto de una inexistente diferenciación espontánea hacia un fenotipo determinado.

La evaluación de los cultivos en los medios a ensayar, con las técnicas histoquímicas, demostraron moderada o intensa reactividad, indicando una buena expresión de rasgos característicos de los linajes de interés. En la tabla 6, se resumen los resultados subjetivos para la caracterización de las monocapas de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón bajo las condiciones inductoras.

Tabla 6. Resumen de las evaluaciones histoquímicas de las monocapas de las células obtenidas del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón mantenidas en los medios inductores ensayados. ++ = Marcaje fuertemente positivo; + = Marcaje Positivo; - = Marcaje Negativo.

Determinación Inmunocitoquímica	Cultivos Control	Cultivos Inducidos
Rojo Alizarina S	-	++
Safranina O	-	+
Azul de Toluidina	-	++
Azul Alcian	-	++
Sudan III	-	+

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente las células del estroma de tejidos neonatales son de gran interés ya que se consideran como fuente alternativa de células troncales con propiedades de autorenovación y diferenciación. Estas células residen en áreas específicas y se encuentran en una proporción muy baja, donde permanecen quiescentes en el tejido hasta que son estimuladas para dar origen a los diferentes tipos de células especializadas que se encuentran en el mismo (Merentes, 2009; Rodríguez, 2010).

El amnios o membrana amniótica es un tejido semi-transparente y delgado, que se origina en las etapas tempranas de la gestación. Esta se desarrolla de tejido extraembrionario y consta de tres capas: un epitelio simple cuboideo, una membrana basal y un estroma avascular (Kim y col., 2009; Niknejad y col., 2008). Su función básica es proteger el desarrollo del embrión del medio intrauterino, evitando la desecación. Además, juega un papel fundamental en el desarrollo del parto, iniciando y manteniendo la contracción uterina mediante la liberación de prostaglandinas (Toda y col., 2007). En los últimos años, la membrana amniótica se ha utilizado ampliamente como biomaterial en cirugía plástica, oftalmología (Tejwani y col., 2007; Sangwan y col., 2007; Santos y col., 2005; Meller y col., 2000), dermatología, tratamiento de lesiones periodontales (Rinastiti y col., 2006), cardiología (corazones isquémicos de ratas) (Cargnoni, 2009) y procedimientos ginecológicos (Morton y Dewhurst, 1986). Así, estudios preclínicos y clínicos han demostrado su utilidad en la reparación de tejido corneal (Shimmura y Tsubota, 2002), lesiones de la médula espinal (Sankar y Muthusamy, 2003), infartos cerebrales (Sakuragawa y col., 1997) y en la enfermedad del Parkinson (Kakishita y col., 2003).

Los avances en la Ingeniería Tisular y la Bioingeniería de Tejidos incentivaron la búsqueda de nuevas fuentes de células madre. Como la membrana amniótica procede de células embrionarias del epiblasto previamente al proceso de gastrulación, se ha sugerido que contiene un reservorio de células madre durante todo el proceso de gestación (Ilancheran y col., 2007). Los primeros aislamientos de células madre de membrana amniótica identificaron dos tipos de células, las células mesenquimales estromales amnióticas (In't Anker y col., 2004) y las células epiteliales amnióticas (Tamagawa y col., 2004), las cuales han despertado un

gran interés por su potencial aplicación en el Trasplante Celular y la Medicina Regenerativa. Desde entonces, se ha producido un incremento de publicaciones sobre protocolos de extracción de células madre de la membrana amniótica pero siguen siendo escasos (Muiños, 2010).

En vista de la importancia que tienen estas células madre mesenquimales como modelo de estudios básicos en la biología del desarrollo y su posible aplicación en la medicina regenerativa para el tratamiento de diversas patologías; en este trabajo se presenta una serie de metodologías adaptadas a la realidad del país que permitieron aislar y establecer los cultivos de células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, evaluando además su capacidad de proliferación, características morfológicas, expresión de algunos marcadores celulares y su potencial de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica bajo condiciones *in vitro*; técnicas y resultados que podrían ser extrapolados en trabajos futuros con humanos.

7.1. Establecimiento de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Las condiciones brindadas a las células provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón cultivadas en monocapa, permitieron el óptimo crecimiento y proliferación y el mantenimiento del potencial de diferenciación de células fusiformes del estroma de la membrana amniótica.

El establecimiento de los cultivos primarios obtenidos por disgregación enzimática y a partir de explantes, retienen la capacidad celular de proliferación después de la disección, la disgregación mecánica e incluso después de ser sometidos a la acción de las enzimas Tripsina y Colagenasa tipo V, como ya se mencionó en la sección anterior.

En las etapas iniciales de los cultivos se pudo apreciar una heterogeneidad celular de la que se puede destacar la presencia de células con morfología fusiforme tipo fibroblasto, células con morfología cuboidal o poligonal similares a epiteliales y células con amplio volumen citoplasmático.

Las células tipo fibroblasto son descritas como las células madre obtenidas del estroma de la membrana amniótica, tanto en trabajos realizados con rata (Marcus y col., 2008) como en humanos (Niknejad y col., 2008; Mihi y col., 2009; Dobрева y col., 2010). Este tipo celular y la morfología que adquieren en

cultivo, es reportado además para otras fuentes de obtención como tejido adiposo (Rodríguez, 2005; Merentes, 2009; Rodríguez, 2010), médula ósea (Acosta, 2003; Fuentes, 2008; Salas, 2010), cordón umbilical (Araos, 2009; Vico, 2009), entre otros. Para determinar que realmente son células madre, es necesaria la utilización de marcadores específicos.

Las células de citoplasma ancho, otro tipo celular observado en los cultivos, se caracterizan por permanecer vivas por largos periodos de tiempo, aumentando de tamaño y aplanándose. Estas células concuerdan con una subpoblación celular existente en la Gelatina de Wharton, reportada por Karahuseyinoglu y colaboradores en el 2007 (Citado en Araos, 2008), los cuales indicaban que no se trataba de células senescentes sino de células semejantes a células madre de naturaleza mesenquimal, con una proliferación y una capacidad de diferenciación similar a la de estas. Las células de citoplasma ancho permanecen en cultivo conjuntamente con las células de morfología fusiforme y presentan una morfología indeterminada, debido a la alteración de los filamentos del citoesqueleto, lo que los hace visibles y forman las barras citoplasmáticas a las cuales se asocian mitocondrias paralelas (Céspedes y Reyes, 2007).

Las células tipo epiteliales deben su aparición a que en el momento de la extracción de la membrana amniótica, se toma el tejido completo, ya que este posee un aspecto homogéneo, y no se realiza separación de la capa epitelial del estroma. Posteriormente, el tejido es sometido a la acción de las enzimas, provocando la liberación de las mismas (Dimri y col., 1995; Muiños, 2010). El fenotipo de estas células puede determinarse o corroborarse, por medio del uso de marcadores epiteliales que determinen la expresión de citoqueratinas, Antígeno de Membrana Epitelial (EMA), lectinas, E-cadherina, entre otros (Sierra, 1991; Rodríguez, 2010).

Este último tipo celular es desplazado rápidamente a medida que transcurren los días desde el establecimiento del cultivo primario y al aumentar el número de pasajes; perdiendo posiblemente su capacidad para continuar hacia el proceso de proliferación.

Lo observado nos indica por tanto que la idea original desarrollada por Friedenstein y colaboradores en la década de los 70 (citado en Acosta, 2003), basada en la adherencia de las células al plástico, proporciona un sistema de cultivo fácil que permite obtener poblaciones de células con potencial de

diferenciación, aunque de una manera poco selectiva, debido a la heterogeneidad inicial de los cultivos, tal como lo exhiben nuestros resultados. Además, los resultados obtenidos en la evaluación de la eficiencia de UFC-F evidencian la presencia de colonias similares a las Unidades Formadoras descritas por Friedenstein y colaboradores. Estos autores encontraron que las colonias constituidas por células de morfología fibroblastoide, formadas al cultivar *in vitro* una suspensión celular a baja densidad, derivan de un solo progenitor; demostraron también la gran capacidad proliferativa de dichas colonias, su habilidad para autorrenovarse y su multipotencialidad a baja densidades (Flores y col., 2006). Con base a lo obtenido experimentalmente, se propone la existencia de células troncales capaces de dar origen a células hijas que pueden permanecer en estado indiferenciado o bien, pueden comprometerse en determinadas rutas de desarrollo, convirtiéndose finalmente a través de la diferenciación, en tipos celulares especializados.

Los explantes fueron establecidos a partir de pequeños trozos de tejido obtenidos de la disgregación mecánica de la membrana amniótica, los cuales presentan remanentes de tejido conectivo permitiendo de manera más rápida la migración y proliferación de las células encontradas en el estroma de dicha membrana. Marcus y colaboradores en el 2008 establecieron cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de rata, por medio de explantes, indicando que la irradiación de las células se produjo de 2 a 3 días después de la siembra, tiempo similar al observado en este trabajo.

La baja heterogeneidad obtenida en los cultivos derivados de explantes y la mediana heterogeneidad de los cultivos establecidos por disgregación enzimática es debida a que en el primer caso, aunque los fragmentos de tejido se hallan compuestos por varios tipos celulares, las condiciones de cultivo ensayadas, facilitan la migración a la placa, en particular, de las células de interés. A diferencia de esto, en el caso de los cultivos obtenidos por disgregación enzimática, todos los tipos celulares son sometidos a la acción de las enzimas, liberándolos y permitiendo su posterior siembra, aunque de igual manera; las condiciones específicas de cultivo favorecen a continuación la selección celular (Calderón, 2007; Marcus y col., 2008; Mihi y col., 2009).

En general, la heterogeneidad celular encontrada ha sido reportada por muchos autores y se debe a que la composición celular en las etapas iniciales de los cultivos primarios se asemeja a las características

intrínsecas del tejido *in vivo*, el cual está compuesto por diversos tipos de células, que pueden ser liberadas una vez que el tejido conectivo es degradado por las enzimas. Además, se ha relacionado con una complejidad funcional de las diferentes poblaciones que tiene múltiples actividades biológicas, según la organización anatómica microscópica del amnios como sistema de multicapas (Niknejad y col., 2008; Dobrevá y col., 2010; Muiños, 2010).

En los cultivos se observó principalmente, el aislamiento y mantenimiento de células con morfología fusiforme, además de una irradiación positiva de éstas a partir de los explantes. En la mayoría de los casos, los cultivos mostraron proliferación elevada, típica de este tipo celular, coincidiendo nuestros resultados con los reportados por otros autores. Aspectos que influyen en la proliferación celular, pueden estar asociados a que algunos lotes de suero y medios base de cultivo utilizados, poseen poca cantidad de algún requerimiento para este tipo celular particular, evitando o retardando así la activación de las vías de señalización que conducen a la mitosis. Además, el tratamiento que reciban las superficies plásticas de cultivo, es crucial en la adherencia de las células a estas.

Para lograr el éxito en la implementación de estas técnicas, se requiere un sistema de cultivo con condiciones controladas, que sean especializadas, pero al mismo tiempo que resulten reproducibles.

7.2. Amplificación de cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Cuando se tiene una monocapa que cubre 80-90 % del espacio disponible del recipiente de cultivo y las células entran en contacto estrecho entre sí, agotándose nutrientes y acumulándose sustancias de desecho, haciendo el pH del medio inadecuado para el crecimiento celular; se inhibe el proceso de multiplicación y proliferación (Sharp, 1980). En este momento se realizaron los subcultivos con el fin de asegurar condiciones óptimas para el mantenimiento de estas en cultivo evitando la inhibición por contacto del crecimiento.

Los subcultivos aumentan notablemente la población celular a lo largo de los pasajes y permite la homogenización del mismo, al predominar aquellos tipos celulares que tienen una tasa de crecimiento

superior a las demás células presentes (Helgason y Millar, 2005), en este caso, las células con morfología fusiforme. De igual manera, la subpoblación de células de citoplasma ancho mostraron una elevada proliferación aunque en menor proporción con respecto a la de las células tipo fibroblastoide. Este aumento en la homogeneidad es dependiente del tiempo de cultivo y del número de pasajes, así como de la acción que ejercen factores paracrinos y autocrinos secretados por las mismas células, los cuales contribuyen en el mantenimiento de la morfología de estas sin rasgos aparentes de senescencia, actúan como mitógenos y mantienen el potencial de diferenciación mediante un mecanismo de acción aún desconocido (Schuldiner y col., 2000; Forbes y col., 2002; Zamudio, 2005). La variación en la proporción de los tipos celulares, demuestra la selectividad de los subcultivos y la colonización de los mismos por las células con mayor capacidad proliferativa. Células con aspecto similar al de las células de citoplasma ancho, se observaban a partir del 3^{er} subcultivo, estas posiblemente se traten de células senescentes ya que presentaban frecuentemente características asociadas a este proceso, tales como: retracción celular, proyecciones citoplasmáticas de diversos tamaños que presentan numerosas vacuolas y segmentación nuclear; dando como resultado final la formación de cuerpos apoptóticos por fragmentación de la célula (Spinelli y Vinay, 1996; Merentes, 2009).

El estroma de la membrana amniótica, está compuesto principalmente por tejido conectivo mesenquimático, el cual se caracteriza por contener células fusiformes con una distribución bastante uniforme, con prolongaciones citoplasmáticas que entran en contacto con prolongaciones similares de células vecinas (Niknejad y col., 2008; Dobрева y col., 2010; Ross y Pawlina, 2007). A medida que los cultivos alcanzan la semiconfluencia, las células se evidencian de forma fibroblastoide típica y con disposición hacia una sola dirección, sin embargo, en presencia de una baja densidad celular, estas tienden a adquirir una morfología más estrellada, extendiendo sus prolongaciones para así lograr contacto con células adyacentes. Estos resultados observados podrían explicar el aumento en el número de células de citoplasma ancho a baja densidad celular, sin necesidad de que estas formaran parte de la subpoblación de células de amplio volumen citoplasmático, concordando además con lo reportado por otros investigadores, donde las células van cambiando de disposición espacial conforme los cultivos alcanzan la confluencia.

Recientemente se demostró que la población de células multipotentes del estroma de la membrana amniótica no parece requerir de muchos factores específicos para proliferar y mantener su viabilidad (Marcus y col., 2008). Sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado la presencia de subpoblaciones de células que pueden variar en cuanto a potencialidad y compromiso así como en tamaño y granularidad. Estas adicionan una variable a los cultivos, ya que son extremadamente sensibles a la densidad de siembra, lo que resulta crítico e importante para la selección, pureza y comportamiento de los mismos. Adicionalmente, la respuesta de las células puede variar de un individuo a otro (Jaiswal y col., 1997; Mihi y col., 2009; Díaz y col., 2010; Muiños, 2010). En contraste, para que las células tipo epiteliales se adapten, proliferen y se diferencien *in vitro*, requieren condiciones de cultivo específicas, así como la presencia de determinadas sustancias que favorezcan su adhesión, proliferación y diferenciación, tales como un sustrato de cultivo semisólido de colágeno el cual simule las condiciones intercelulares que se expresan en el tejido nativo y medios de cultivo enriquecidos con el factor de crecimiento epitelial (EGF) que mantiene y estimula el crecimiento de estas células y disminuye el desprendimiento celular por pérdida de las uniones celulares, e insulina que junto con el EGF genera el microambiente necesario para el mantenimiento de este fenotipo diferenciado en condiciones *in vitro* (Gil, 2007; Sueblinvong y col., 2007; Schneider y col., 2008), por lo que bajo las condiciones suministradas en este trabajo son desplazadas casi en su totalidad, desde las etapas iniciales de los cultivos primarios.

7.3. Determinación de la proliferación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

El crecimiento celular implica el incremento de todos los elementos, lo que se traduce en un aumento en la masa celular y posteriormente, su multiplicación (Sharp, 1980; Freshney, 2000). Para poder predecir la proliferación de un cultivo es importante conocer la cinética de crecimiento de éste, lo que nos permite estudiar las respuestas de la célula ante un estímulo particular.

La tasa de proliferación de un cultivo celular, genera información acerca de las propiedades que presentan las células en cultivo, así como también facilita el diseño experimental, permitiendo determinar la

cinética del mismo, la cual consta de de cuatro fases: una fase de latencia donde las células se adaptan al medio y el crecimiento es lento o nulo, una fase exponencial donde incrementa la proliferación y la población celular aumenta de manera logarítmica, una fase estacionaria la cual se caracteriza porque el crecimiento celular permanece constante y una fase de muerte celular donde las células entran en la etapa de senescencia y mueren (Morgan y Darling, 1995; Madigan y col., 1997; Clynes, 1998; Freshney, 2000; Gil, 2007; Davis, 2011). La curva de crecimiento además, nos permitió corroborar el mantenimiento de la viabilidad y la estimulación del crecimiento de las células en cultivo.

Para el estudio del crecimiento *in vitro* de las células del estroma de la membrana amniótica, se realizaron ensayos de proliferación en donde las células se cultivaron en medio nutritivo con diferentes concentraciones de SFB. A diferencia de la cinética de crecimiento característica, los resultados no evidenciaron una fase de muerte celular posiblemente debido a que aun se disponía de nutrientes y factores en el medio de cultivo, necesarios para el mantenimiento y funcionamiento celular.

La proliferación y mantenimiento a mediano plazo de las células adherentes obtenidas, posiblemente se deba a que estas no presentan una elevada actividad telomerasa, enzima encargada de replicar telómeros, por lo que estos permanece sin replicar al final de cada fase S de la mitosis. De esta forma, en ausencia de la enzima, los telómeros se acortan con cada división celular. Cuando alcanzan una longitud crítica, las células detienen su proliferación y adquieren características morfológicas y funcionales diferentes. A esta respuesta se le llama senescencia celular o replicativa (Greider y Blackburn, 1989; Prowse y Greider, 1995; Holt y col., 1997; Kim y col., 2002). Esta disminución de la actividad telomerasa, ayuda a comprender el hecho de que estas células tengan una mediana capacidad de mantenimiento pero una mayor rapidez de expansión, mecanismo que les permite perpetuar la población.

Gregory y colaboradores en el 2005 (Citado en Rodríguez, 2010) planteó que durante la fase de latencia, se expresa de forma transitoria la molécula Dickkop – 1 ($Dkk - 1$), la cual está relacionada con la proliferación. Cuando las células tipo fibroblastoides son sembradas a bajas densidades, estas tienen una corta fase de latencia y poseen una alta expresión de esta molécula que disminuye a medida que incrementa la densidad celular. Se ha señalado que probablemente actúe como un inhibidor de la diferenciación.

El SFB provee componentes como aminoácidos, lípidos, factores de crecimiento, vitaminas, hormonas e inhibidores de proteasas, en cantidades desconocidas que varían entre los diferentes lotes y los cuales pueden estimular la proliferación y mantener la morfología celular sin rasgos aparentes de senescencia (Madigan y col., 1997; Freshney, 2000; Davis, 2011). Durante la fase exponencial se produjo una alta densidad celular que luego se mantuvo, probablemente se deba a que el crecimiento de las células en cultivo es influenciado por dichos factores en el SFB del medio nutritivo. Es importante señalar que esto se corresponde con los resultados obtenidos, donde las células cultivadas con 20% SFB, mostraron levemente una mayor tasa de proliferación con respecto a las células cultivadas con 15% SFB y estas a su vez, con respecto a las células cultivadas con 10% SFB, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la fase de saturación se observó un mantenimiento en la densidad de células viables metabólicamente activas, lo que puede adjudicarse a la acumulación de detritos en el medio o a la confluencia de la monocapa en el cultivo, ya que las células no tumorales son inhibidas por contacto con otras células, lo que disminuye su proliferación. Cuando esto ocurre, la división celular se reduce y eventualmente se pierde (Freshney, 2000; Brozka y col., 2005). Esta característica proliferativa está íntimamente relacionada con la expresión de los genes que inducen la proliferación solo en la etapa de crecimiento.

Mediante la utilización, tanto de la curva de crecimiento como del ensayo del MTT donde la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido y a su vez, a la densidad óptica registrada, se demostró que a los 4 días de cultivo, comienza la fase de crecimiento logarítmico. Gracias a la información obtenida, se estableció el régimen de tiempo requerido para realizar los subcultivos, ya que estos varían significativamente en cuanto a sus propiedades según la fase en la que se encuentren. El período más apropiado para realizar los pasajes celulares es la fase exponencial, dado que el cultivo se encuentra en su forma más reproducible y viable (Helgason y Miller, 2005). Este comportamiento concuerda con el comportamiento de las células observado durante el tiempo de experimentación, ya que el tiempo promedio entre cada subcultivo era de aproximadamente 9 días, suficiente para alcanzar la fase exponencial y que las células doblaran su población, llegando así los cultivos rápidamente a la confluencia.

Se sugiere la utilización de dichas técnicas como alternativas relativamente económicas, de fácil ejecución y de las cuales se obtienen resultados satisfactorios, con el propósito de evaluar la proliferación de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón en respuesta a condiciones determinadas de cultivo.

Cabe destacar que el comportamiento proliferativo de las células provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón fue similar al reportado por Díaz y colaboradores en el año 2007 y Mihi y colaboradores en el 2009, investigaciones realizadas con membrana amniótica de fetos humanos, lo que nos indica que aunque las células son obtenidas de dos fuentes animales diferentes, las características biológicas en cuanto al crecimiento son parecidas. Esto podría sugerir que las células son homólogas y poseen un comportamiento similar bajo ciertas condiciones *in vitro* suministradas.

7.4. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

Las muestras de tejido son invariablemente heterogéneas. Las réplicas varían en la constitución del tipo celular. Después de unos pocos días de realizado el establecimiento primario, los cultivos asumen una constitución más o menos homogénea. Como las células están dispersas aleatoriamente y la presión selectiva de las condiciones *in vitro* suministradas tienden a producir una población homogénea, sobrevive el tipo celular más apto (Freshney, 2000).

Al realizarse las coloraciones citoquímicas con May Grünwald-Giemsa, se observó que desde el punto de vista morfológico, los cultivos presentaban básicamente 2 tipos celulares, esto es; células de morfología fusiforme, tipo fibroblastos y células con amplio volumen citoplasmático, predominando las primeras a medida que aumentaba la densidad celular en cultivo. También se pudo apreciar en escasa proporción, un 3^{er} fenotipo caracterizado por una población de células con morfología cuboidal o poligonal, similares a células epiteliales. Como ya se mencionó anteriormente, estas son desplazadas casi en su totalidad, desde las etapas iniciales de los cultivos primarios.

Las células tipo fibroblasto, son las de mayor interés en este trabajo, cuya morfología ahusada con escaso citoplasma y núcleos ubicados en la región más engrosada del mismo, es reportada de igual manera al realizarse aislamientos celulares con procedimientos similares en membrana amniótica humana y de rata, investigaciones en las cuales además se ha determinado que son células troncales al detectarse expresión de Oct-4, SSEA-4, Sox-2, Nanog y marcadores de células madre mesenquimales CD29 y CD105, entre otro (Linju y col., 2005; Marcus y col., 2008; Mihy y col., 2009; Díaz y col., 2010).

Estudios previos han determinado que las células tipo fibroblastos poseen un retículo endoplasmático rugoso desarrollado, un aparato de Golgi perfectamente definido y escasas vesículas de secreción, organelos que se relacionan con la síntesis de moléculas precursoras de colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz extracelular. Así mismo, presentan un desarrollado citoesqueleto (Gil, 2007; Torres, 2007 citado en Calderón, 2007; Davis, 2011).

La basofilia citoplasmática observada tanto en las células con morfología fusiforme como en las células de citoplasma ancho, indica un aumento en la cantidad de retículo endoplasmático rugoso que se asocia con síntesis proteica (Ross y Pawlina, 2007). Esta característica de tinción que presentan las células de amplio volumen citoplasmático, aunado a su persistencia durante varios subcultivos y la ausencia de rasgos propios de células senescentes; respalda la hipótesis de que este tipo celular constituye una subpoblación de las células tipo fibroblasto.

Las características morfológicas de las células del estroma de la membrana amniótica, observadas en esta investigación, corresponden a las descritas por numerosos autores y corroboran la homología histológica entre el amnios de ratón y de humano (Linju y col., 2005; Alviano y col., 2007; Díaz y col., 2007; Marcus y col., 2008; Mihy y col., 2009; Dobрева y col., 2010).

Las células de morfología fusiforme, aisladas con cualquiera de los dos protocolos usados en este estudio, mostraron adherencia al plástico del frasco de cultivo y un fenotipo fibroblástico, características propias de las células troncales aisladas de médula ósea. Con respecto a la caracterización inmunocitoquímica, se demostró la presencia de marcadores que previamente han sido descritos para las células madre de médula ósea, como son Vimentina, Stro-1 y la ausencia de antígenos del Complejo Mayor

de Histocompatibilidad (Mihu y col., 2009; Kobayashi y col., 2008). El patrón de expresión de antígenos de las células de interés obtenidas en este estudio resultó consistente con los datos publicados previamente para células aisladas tanto del amnios humano como de otras regiones placentarias (Bailo y col., 2004; Barlow y col., 2008; Bilic y col., 2008; Kobayashi y col., 2008; Mihu y col., 2009).

Las técnicas de inmunocitoquímica permiten la identificación, sobre muestras citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas celulares. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos (Ross y Pawlina, 2007; Eynard y col., 2008; Montuenga y col., 2009). Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos, se discutirá separadamente la expresión de cada marcador.

La Vimentina es una proteína integrante del grupo de los filamentos intermedios, cuya expresión generalmente, ocurre en células fenotípicamente de origen mesenquimático y la cual se encuentra unida al retículo endoplasmático, mitocondrias y al núcleo; desempeñando un papel importante en la integridad del citoplasma y morfología celular, soporte y anclaje de las organelas y en la organización del citoesqueleto (Maillet, 2003). La expresión de esta glicoproteína es típica en estas células tipo fibroblasto, debido a su origen mesodérmico; característica reportada por Goldman y colaboradores en 1996 y la cual concuerda con lo observado en este trabajo.

De igual manera, los ensayos inmunocitoquímicos para detectar marcadores membranales específicos de células troncales mesenquimales, muestran que las células presentes en nuestros cultivos derivados de las digestiones de las membranas amnióticas de fetos de ratón son positivas además, al marcador Stro-1. En 1991 se identificó a Stro-1 (por Simmons y Torok-Storb, de ahí sus siglas) como un antígeno específico para células madre de origen mesenquimal. Este es expresado por precursores de células del estroma, identificado como una molécula presente en células adherentes indiferenciadas (Goncalves y col., 2006). Estos ensayos inmunocitoquímicos concuerdan con estudios previos donde aislaron y caracterizaron células madre a partir de membrana amniótica humana, siendo positivas las colonias

celulares a dichas determinaciones lo cual nos ayuda a sugerir que las células aisladas en nuestro estudio son células indiferenciadas de naturaleza mesenquimal. Asimismo, estos marcadores en combinación con marcadores como CD29, CD105, SH-2, SH-3 y SH-4 entre otros; han sido extensivamente utilizados para caracterizar colonias altamente puras de células madre mesenquimales aisladas a partir de médula ósea.

Por otro lado, las células del estroma de la membrana amniótica mostraron peculiarmente una muy baja o inexistente expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, lo que sugiere la presencia de células inmunológicamente inmaduras. La inexpressión de moléculas H2, implicadas en la tolerancia inmune, resulta de capital importancia dado que este tejido se encuentra intermedio entre el líquido amniótico y la decidua materna, y se comporta como un componente inerte frente al sistema inmune materno, evitando así una respuesta de rechazo ante el feto (Cabero y col., 2007). La baja expresión de estas proteínas en células extraídas de la membrana amniótica de rata y humana también es reportada por Marcus y colaboradores en el 2008 y Mihu y colaboradores en el 2009, respectivamente.

La demostración *in vitro* de que las células madre mesenquimales no expresan los antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad de clase II ha sugerido que estas células podrían suprimir las reacciones inmunes inducidas y constituyen un potencial terapéutico en la enfermedad de injerto contra huésped. Se ha demostrado que estas células liberan citocinas inmunosupresoras, como el factor de crecimiento del hepatocito, la interleucina 10 y el TGF- β 1, en concentraciones que suprimen la alorrespuesta *in vitro*. También expresan la ciclooxigenasa 1 y 2 y producen prostaglandina E2 constitutivamente. Estudios de bloqueo confirman que las prostaglandinas contribuyen a la alosupresión mediada por estas células (Tse y col., 2001; Le Blanc y col., 2003). Estudios de cocultivo o cultivo entre células alogénicas *in vitro*, tanto en modelos animales como humanos, en presencia de células troncales embrionarias de naturaleza mesenquimal, demuestran que los factores solubles derivados de estas últimas modulan la respuesta inmune y sugieren que esto genera un microambiente inmunosupresor capaz de modular la alorrespuesta. Esta acción inmunorreguladora es comparable con la referida en la tolerancia materno-fetal y muy similar a la descrita en los mecanismos de las células tumorales para evadir a la respuesta inmunológica (Tse y col., 2001; Ryan y col., 2005).

Las observaciones microscópicas realizadas indican que las condiciones probadas en este trabajo, permiten el establecimiento y crecimiento de las células provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón con características de células madre de naturaleza mesenquimal (Behzad y col., 1994; Alviano y col., 2007; Tan y col., 2011). Sin embargo, para corroborar estos resultados se requiere la utilización de marcadores específicos de células madre mesenquimales tales como SH2, SH3, SH4, Nanog, Oct-3/4, Sox-2, CD49 y el antígeno embrionario SSEA-4 sugerido recientemente para las células estromales de la médula ósea (Jiang y col., 2002a; Linju y col., 2005; Beyer y col., 2006; Arévalo y col., 2007); no obstante, hasta el momento no existe un marcador universal que permita la identificación de dichas células.

Un factor importante en el cultivo de células madre mesenquimales es el crecimiento simultáneo de fibroblastos del tejido conectivo. Existen algunas diferencias morfológicas entre las células madre mesenquimales y los fibroblastos pero estas poblaciones celulares también pueden ser fácilmente confundidas, inclusive sus inmunofenotipos son muy similares. Ishii y colaboradores en el 2005 determinaron la expresión de 26 antígenos en células troncales de naturaleza mesenquimal de médula ósea humana y fibroblastos, encontrando una expresión diferencial solamente en el antígeno CD49b (integrina $\alpha 2$) y HLA-DR (Rodríguez y col., 2010). Esto demuestra que la caracterización de estas células tiene que incluir, además de la evaluación morfológica y del inmunofenotipo, pruebas biológicas como las de diferenciación celular *in vitro*.

7.5. Análisis de la diferenciación de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón

En este trabajo, se han desarrollado estudios *in vitro* para identificar la población celular de la membrana amniótica asociada con una mayor capacidad de diferenciación celular. Con una estimulación adecuada, las poblaciones celulares derivadas del amnios de ratón se diferencian hacia linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, indicando la presencia de células troncales de naturaleza mesenquimal.

Con el fin de analizar la potencialidad de las células del estroma de la membrana amniótica se ensayó la acción de una serie de factores conocidos como inductores usando como estrategia de cultivo, el cultivo en monocapa. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo, ha brindado la posibilidad de simular un

microambiente apto donde proliferan y se diferencian dichas células, permitiendo su ubicación espacial y la retención de sus funciones, lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo. La eficiencia de la diferenciación depende también de la cantidad y calidad de las células mesenquimatosas que se estén utilizando.

Se pudo observar en la población de células cultivadas sin añadir factores inductores al medio de cultivo, que no ocurre mineralización u osificación de matriz extracelular ni cambios morfológicos aparentes en las células, indicando que en los cultivos control no se produce una respuesta espontánea de diferenciación, manteniendo las células su fenotipo indiferenciado. Hay que considerar la posibilidad de que las condiciones suministradas iniciaron cascadas de reacciones de señalización que pueden desactivar genes que inician la inducción o que dichas célula simplemente no estuviesen comprometidas hacia un linaje particular. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Muiños en 2010 al trabajar con células progenitoras de naturaleza mesenquimal provenientes de amnios humano, donde no se reporta diferenciación alguna en las monocapas control.

Con respecto a las células cultivadas en monocapa en presencia de factores inductores, se obtuvo una diferenciación hacia todos los linajes de interés, evidenciado por las tinciones empleadas las cuales resultaron positivas. De igual manera se pudo apreciar la tendencia de aumento en la expresión de rasgos característicos de los linajes de interés, lo que corresponde con una mayor diferenciación a medida que se induce por más tiempo y los cultivos alcanza la semiconfluencia, confirmando la importancia de los ciclos de inducción y mantenimiento, el primero inicia la diferenciación, mientras que el segundo promueve el desarrollo del fenotipo particular. Se ha señalado que en muchos sistemas celulares la proliferación es incompatible cuando se inicia la expresión de propiedades diferenciadas, por lo tanto durante la fase de menor crecimiento, es posible que las células comiencen a expresar genes ligados al proceso de diferenciación celular, mientras que se inhiben los genes ligados a la proliferación. Una vez que se dan todos los cambios relacionados con un tipo celular diferenciado, se activan los genes de la proliferación con la finalidad de amplificar y mantener el fenotipo diferenciado obtenido por la simulación apropiada del microambiente (Freshney, 2000; Guilak y col., 2003; Brozka y col., 2005; Rodríguez, 2010). Estudios similares de diferenciación han sido realizados en

membrana amniótica humana por autores como Linju y colaboradores en el 2005 y Díaz y colaboradores en el 2007, reportando resultados concordantes con los nuestros, lo que apoya aun más lo expuesto en este estudio.

Los factores interactúan a nivel de la membrana celular con receptores específicos. El reconocimiento de la señal extracelular por su receptor es el comienzo de una serie de eventos que llevan la información desde el exterior de la célula hacia su interior, hasta generar una respuesta. La transferencia de la información hacia el interior celular se conoce como mecanismo de Transducción de Señales. Este proceso, desencadena una serie de reacciones bioquímicas intracelulares provocando una cascada de señalización, cuyo resultado es la amplificación de la señal la cual llegará al núcleo donde ejercerá su efecto sobre la expresión de genes duplicando el ADN, transcribiendo el ADN o estimulando la síntesis proteica (Taleisnik, 2006).

Nuestros resultados demuestran que las condiciones brindadas por el sistema de cultivo por sí solo, no son suficientes para inducir la diferenciación hacia los linajes de interés, indicando la necesidad de factores de diferenciación que generen cambios en la expresión génica de las células promoviendo la inducción hacia un fenotipo particular. Una vez que esto ocurre, es importante señalar que las células liberan factores autocrinos y paracrinos que actúan localmente e influyen y regulan la diferenciación de células vecinas (Jaiswal y col., 1997; Zuk y col., 2002; Pineda y Londoño, 2009).

La insulina es una hormona polipeptídica cuyo monómero consta de 51 aminoácidos y tiene peso molecular (PM) de 5,5 KDa (Koolman y Röhm, 2005). Es producida y secretada por las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo llamado proinsulina. Actúa de manera autocrina o paracrina por unión a su receptor de membrana. *In vivo*, se encarga de la regulación del metabolismo de la glucosa y la síntesis lipídica (Mathews y col., 2003). *In vitro*, esta proteína, principalmente estimula la proliferación celular debido a sus propiedades de mitógeno. Tiene además un papel importante en la estimulación de la síntesis de glicógeno, de ácidos grasos, de matriz ósea y su mineralización. La insulina promueve la diferenciación solamente a concentraciones suprafisiológicas, manteniendo fenotipos celulares diferenciados; función que realiza uniéndose además, al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina

tipo 1 (IGF-1), potenciando su efecto; factor que estimula la diferenciación a concentraciones mucho menores y que parece ser el inductor fisiológico de las células madre mesenquimales y en los progenitores comprometidos (Geneser, 1993; Cornelius y col., 1994; Viveros y col., 2003; Fuentes, 2008).

Otros factores solubles de importancia en este trabajo son la dexametasona y el ácido ascórbico. La dexametasona es un glucocorticoide sintético que posee propiedades antiinflamatorias, inmunosupresoras y reguladoras del calcio sanguíneo (Fuentes, 2008). Es capaz de difundir pasivamente a través de la membrana celular por su alta liposolubilidad, para ligarse a su receptor específico en el citoplasma, produciéndose así un complejo esteroide - receptor activado capaz de penetrar en el núcleo donde ha de regular la expresión de los genes que responden específicamente a los glucocorticoides, modulando su transcripción y modificando la función celular hasta el grado de inducir la diferenciación hacia un fenotipo específico (Hernández, 2003 citado en Rodríguez, 2010). Este glucocorticoide puede inducir la expresión del sistema cartilaginoso promoviendo la mineralización de la matriz extracelular; regular la expresión y activación de genes de osteocalcina y sialoproteína ósea, aumentando la actividad de la colagenasa y la fosfatasa alcalina (FA), secreción de componentes osteogénicos de matriz extracelular y la acumulación de mineral en las células produciendo la diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico y además, puede inducir la formación de inclusiones lipídicas y la expresión del factor de transcripción C/EBP (CCAAT / Potenciador de Proteínas de Unión) el cual es un factor nuclear indispensable y crítico para el proceso de adipogénesis. Todo esto se logra a concentraciones fisiológicas (10 nM), ya que a condiciones suprafisiológicas, produce efectos antagónicos (Viveros y col., 2003; Hall, 2005; Rosen, 2005; Phillips y col., 2006; Fuentes, 2008).

El ácido ascórbico (vitamina C reducida) es otro suplemento esencial para la diferenciación de las células madre mesenquimales a fenotipo óseo – condrogénico (Xiao y col., 1997). Puede actuar como antioxidante, agente dador de electrones, cofactor para el óptimo funcionamiento de varias enzimas y como sustrato enzimático (Mathews y col., 2003). Se reporta que este factor induce un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina y en la expresión del ácido ribonucleico (ARN), mensajero de la osteocalcina; ambas proteínas relacionadas con un fenotipo óseo (Franceschi y col., 1994). En cultivo celular, estimula además, la hidroxilación de aminoácidos y la conversión de procolágeno a colágeno. La síntesis normal de colágeno

depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el retículo endoplasmático de la célula, para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente. Las enzimas hidroxilasas, que catalizan esta hidroxilación, requieren ácido ascórbico para funcionar correctamente; de lo contrario; no se dará la formación en triple hélice de las fibras de colágeno de la matriz extracelular que permiten mantener la estructura de los tejidos (Fuentes, 2008). Además, incrementa la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea, participando de esta forma, en todas las fases de la osteogénesis hasta formar los osteocitos maduros (Jingushi y col., 1990; Lee y col., 2003; Tuan y col., 2003).

Un cuarto factor soluble es el β - glicerofosfato. Este es un fosfato orgánico utilizado como suplemento del medio para la diferenciación osteogénica gracias a su capacidad para estimular la mineralización de la matriz extracelular *in vitro*, induciendo la formación de calcio al encontrarse en concentraciones del orden de 10^{-6} M. Es un sustrato de la fosfatasa alcalina ósea, en cuya reacción enzimática se produce un incremento de fosfatos inorgánicos en el medio, los cuales serán luego convertidos en cristales de hidroxiapatita que producen la mineralización (Hamade y col., 2003).

En este trabajo se señala la obtención de diferenciación hacia linaje osteogénico evidenciado por la coloración positiva con Rojo Alizarina S, lo que indicó la deposición de fosfatos de calcio propios de las etapas tempranas de mineralización de la matriz extracelular.

Los requerimientos y las condiciones efectivas para inducir en las células del estroma de la membrana amniótica la síntesis de una matriz extracelular propia de un tejido estable, no están bien definidas (Boeuf y Richter, 2010). Nuestros resultados podrían estar indicando que los medios utilizados posee una composición adecuada para inducir diferenciación hacia linajes mesodermales en los tipos celulares extraídos del amnios. Un mismo factor soluble no específico puede activar distintas rutas bioquímicas según la fuente de extracción de células madre mesenquimales, de modo que cada tipo celular, en función de su origen, podría tener requerimientos específicos para inducir la expresión de un fenotipo particular (Kuske y col., 2011; Boeuf y Richter, 2010); así el ácido ascórbico y la dexametasona por ser un glucocorticoide no específico, pueden estimular tanto la síntesis de matriz extracelular como su mineralización (Cheng y col., 1994; Franceschi y col., 1994; Fuentes, 2008; Quiroz y col., 2008).

De igual manera se evidenció una marcada diferenciación hacia un linaje condrogénico, gracias a la coloración positiva obtenida con Safranina O al detectar la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados los cuales se encuentran depositados en la matriz extracelular cartilaginosa. Además, mediante las coloraciones de Azul de Toluidina y Azul Alcian pH 2,5 se logró poner en manifiesto la presencia de proteoglicanos ácidos sulfatados y de glicosaminoglicanos ácidos carboxilados, respectivamente; ambos componentes de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso en formación.

Las coloraciones realizadas a los cultivos mantenidos con medio inductor osteogénico y condrogénico resultaron positivas en los nódulos formados, en formación y en las células que irradian de estos pero no en las células aisladas, presumiendo que la formación de dichos agregados celulares es esencial para la deposición de una matriz extracelular y su mineralización. La formación de estos nódulos ocurre como una respuesta espontánea, apreciándose en general la migración de células a partir de ellos. Este comportamiento es atribuible a las condiciones propias del cultivo, ya que en investigaciones anteriores se discute el poder estar en presencia de un proceso de osteogénesis o condrogénesis, debido a que los agregados celulares pueden asemejar las condiciones bajo las cuales se produce la diferenciación *in vivo* (Guilak y col., 2003; Díaz y col., 2010; Muiños, 2010). Lo anterior también puede asociarse al bajo nivel de oxígeno necesario para la inducción de las células troncales de naturaleza mesenquimal hacia linaje condrogénico y/o osteogénico, por lo que estas migran formando agregados; a medida que los niveles de oxígeno se reducen, comienza una señalización por medio de una cascada de reacciones que puede activar o desactivar ciertos genes, siendo la hipoxia una señal importante que induce la inhibición de la proliferación y estimula la diferenciación. La formación de éstos además, refuerzan condiciones inductoras claves, haciendo más íntimo el contacto célula – célula y célula – matriz extracelular (Bianco y col., 2001; Guilak y col., 2003; Rodríguez, 2005; Weismann y Meyer, 2006).

Sin embargo, se observó que a pesar de haber sembrado la misma densidad celular en ambas condiciones de cultivo a ensayar, en los mantenidos en medio de diferenciación osteogénica primero se tenía que formar una monocapa y posteriormente formarse los agregados celulares de los cuales migraban células, mientras que en los cultivos mantenidos en medio de diferenciación condrogénica los nódulos se formaban

sin necesidad de una monocapa previa y a partir de ellos migraban células para la formación de la misma. Este hecho indica que dichos medios inductores estimulan además, migración y proliferación celular, respectivamente.

El tejido adiposo cuenta con un alto metabolismo y sirve como depósito de energía, además mantiene la homeostasis de la glucosa y secreta hormonas y citoquinas. En este caracterizamos además la inducción a la diferenciación de las células con características de células troncales mesenquimales a células similares a las del tejido adiposo.

Los inductores para la diferenciación de adipocitos han sido identificados empíricamente (Smith y col., 1988; Viveros y col., 2003). Los inductores más eficaces, en varios modelos de cultivo, incluyen a la insulina, al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) la isobutilmetilxantina y a la indometacina.

La isobutilmetilxantina actúa sobre las células madre mesenquimales regulando el compromiso de estas, ya que este es un inductor del Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) intracelular el cual inicia la adipogénesis mediante la activación temprana de CREB (proteína de unión a un elemento de respuesta a AMPC) el cual participa en la inducción de la expresión de C/EBP β (CCAAT / Potenciador β de Proteínas de Unión) (Farmer, 2006). La función de la indometacina está dada como un activador del factor transcripcional PPAR γ el cual es expresado ampliamente en la diferenciación adipogénica. Al unirse al PPAR γ se produce una activación del factor transcripcional PPAR α (Proliferador de Peroxisomas – Activador del Receptor Alpha) interviniendo de esta manera en la cascada de señalización de la diferenciación, inhibiendo la ciclooxigenasa y sustituyendo a los glucocorticoides (Lehmann y col., 1997; Janderová y col., 2003; Fuentes, 2008).

Al adquirir compromiso, las células madre mesenquimales se dividen dando origen a los adipoblastos, los cuales son las células adipoprogenitoras. Estos proliferan convirtiéndose en preadipocitos que contienen marcadores tempranos de adipocitos (lipoproteínas lipasa). Los preadipocitos no acumulan triglicéridos y se dividen originando adipocitos inmaduros capaces de sintetizar y degradar dicho componente acumulando cantidades crecientes de vacuolas lipídicas aumentando de tamaño, aunque algunos conservan su morfología ahusada. Estos continúan dividiéndose y se convierten en adipocitos maduros. Mediante el análisis microscópico se pudo apreciar una gran proporción de inclusiones lipídicas citoplasmáticas en un bajo

porcentaje de células de morfología ahusada. Al ocurrir la inducción a la diferenciación adipogénica, las células de morfología fusiforme comenzaron a acumular grasas neutras en el citoplasma en forma de vacuolas o inclusiones, las cuales incrementaron gradualmente a medida que avanzaron los días de cultivo bajo los efectos de los factores solubles, sin presentar cambios morfológicos aparentes. Este comportamiento reflejado en nuestros resultados presume que bajo las condiciones suministradas, algunas de estas células adquirieron compromiso hacia un linaje adipogénico. Esto se pudo evidenciar con la positividad de la evaluación histoquímica con sudan III, la cual demostró la presencia de células con características similares a adipocitos inmaduros multiloculares, coloreando los lípidos acumulados en el citoplasma, que aparecen durante dicho proceso.

Aunque en este trabajo se obtuvo una baja proporción de células diferenciadas hacia un linaje adipogénico, se logró corroborar que dicha inducción ocurrió bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, para mejorar estos resultados es necesario aumentar los días de cultivo en el medio base para inducir la diferenciación y/o las concentraciones de los factores solubles utilizados. Adicionalmente, se podría potenciar la acción de los medios inductores agregando otros factores con actividad hormonal como el IGF-1, glucocorticoides, triyodotironina y AMPc y/o parahormonal como el factor β de la serin-adipsin-proteasa y factor estimulante de la acilación (ASP), que actúan directamente sobre los factores de transcripción adipogénicos C/EBP, PPAR y ADD1/SREBP1 para inducir tanto la diferenciación a adipocito, como los cambios del patrón de proliferación en la célula inducidas (Student y col., 1980; Amri y col., 1986; López y Tiravanti, 2011). Viveros y colaboradores en el 2003 reportan que estos en combinación con concentraciones elevadas de insulina, dexametasona e isobutimetilxantina actúan sobre la adenilciclasa aumentando el AMPc intracelular, mostrando ser más potente para inducir diferenciación de los preadipocitos.

Fuentes en el 2008 realiza estudios de diferenciación en cultivos en monocapa utilizando células madre de naturaleza mesenquimal provenientes de médula ósea, obteniendo una diferenciación positiva hacia linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico, incluso en la primera semana de inducción exponiendo que las células madre adultas son más fácilmente diferenciables que las células madre embrionarias, debido a que las primeras pueden expresar receptores que activen de manera más rápida las vías de señalización

celular al encontrarse comprometidas, dando como resultado un proceso de diferenciación hacia linajes particulares (Pecorino, 2001 citado en Araos 2009).

En trabajos futuros, se podría ensayar los efectos de otros factores solubles reportados, capaces de ejercer diferenciación como por ejemplo; para la diferenciación osteogénica, el medio basal puede ser suplementado con factores morfogenéticos óseos (BMP-2 y BMP-4) y ascorbato. Para la inducción adipogénica, el medio basal puede enriquecerse con los factores previamente mencionados y para la diferenciación condrogénica puede emplearse el factor de crecimiento transformante tipo beta 1 (TGF- β -1), ácido retinoico, transferina y/o monotioglicerol.

Aunque las tinciones utilizadas en nuestro estudio son consideradas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como pruebas “*gold standard*” para validar la diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales, existen otros posibles marcadores que pueden ser utilizados para corroborar la diferenciación de dichas células hacia los tres linajes mencionados. Por ejemplo, para la diferenciación adipogénica se puede evaluar la expresión de los genes de lipoproteinlipasa, PPAR- α y adiponectina los cuales se encuentran presentes en células adiposas. La diferenciación osteogénica es posible evaluarla mediante la detección de osteonectina, osteopontina y sialoproteína ósea. Los antígenos específicos para células condrogénicas como CD49c, CD49e, CD49f y CD151 pueden ser evaluados mediante citometría de flujo, según Grogan y colaboradores en 2007 su expresión indica alta capacidad condrogénica *in vitro*. Adicionalmente sería importante identificar qué tipo de componentes son sintetizados por las células del estroma de la membrana amniótica en presencia de los medios inductores empleados en este trabajo, para lo que sería necesario estudios inmunocitoquímicos contra colágeno tipo II y agregán, contra colágeno tipo I y grasas neutras.

En general, nuestro estudio cumplió con los tres criterios establecidos por dicha Sociedad para caracterizar las células madre mesenquimales, corroborando la capacidad de adherencia en plástico de las células aisladas de morfología fibroblastoide, la expresión de antígenos de superficie de células troncales de naturaleza mesenquimal y su inducción a la diferenciación *in vitro* hacia linajes mesodérmicos.

8. CONCLUSIONES

1. Las técnicas de disgregación enzimática y de cultivo por explantes permitieron el aislamiento y la fácil obtención de los cultivos primarios de las células del estroma de la membrana amniótica de ratón, aunque mostraron una capacidad proliferativa diferencial entre ellos. En estos fue evidente una heterogeneidad caracterizada por dos tipos principales de fenotipos celulares: una población de células con morfología fusiforme y una de células de amplio volumen citoplasmático; la cual dependió de las características intrínsecas del tejido de origen.
2. Los subcultivos celulares permitieron la obtención de una población celular más homogénea y la colonización de los mismos por las células con mayor capacidad proliferativa.
3. Los ensayos de caracterización morfológica e inmunocitoquímica, revelaron la obtención de células con características de células troncales de naturaleza mesenquimal, las cuales en su mayoría, corresponden a células con morfología fusiforme en estado indiferenciado y de origen mesodérmico, indicado por el buen grado de expresión de Vimentina y Stro-1, respectivamente. Además, la inexpressión de antígenos de histocompatibilidad H2 sugiere la presencia de células inmunológicamente inmaduras.
4. Se establecieron las condiciones de cultivo óptimas que permitieron el mantenimiento a mediano plazo de la viabilidad de las células mesenquimales, lográndose un efecto estimulador de la proliferación celular en los cultivos primarios y subcultivos posteriores. Estas fueron expandidas hasta el 3^{er} pasaje sin cambios fenotípicos aparentes ni características morfológicas asociadas a senescencia.
5. Los cultivos, obtenidos por la técnica de disgregación enzimática mostraron un comportamiento proliferativo caracterizado por tres fases; lo que permitió determinar el tiempo promedio entre cada pasaje.

6. Las células mesenquimatosas no diferenciadas provenientes del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, responden a señales presentes en el microambiente *in vitro*, las cuales podrían ejercer un control paracrino sobre dicha población, estimulando la diferenciación hacia diversos linajes celulares, como se demostró en este trabajo. Esto sugiere que la interacción célula – célula, célula – componente de matriz extracelular son importantes fuentes de señalización que pueden influir sobre la diferenciación y morfogénesis de estas células.
7. La acción de los factores solubles utilizados, permitió en menor o mayor grado, la canalización en monocapa de las células adherentes del estroma de la membrana amniótica de fetos ratón hacia linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico; siendo estos importantes para lograr la biosíntesis de componentes citoplasmáticos y de matriz extracelular al simular parte del microambiente *in vivo* que puede generar una dinámica celular inductora de la diferenciación.
8. La interacción célula – célula, la acción de factores paracrinos y la baja tensión de oxígeno, son factores claves en la inducción osteogénica y condrogénica.
9. Se logró en baja proporción la canalización adipogénica bajo las condiciones ensayadas en este estudio, lo que sugiere que se requiere incorporar al medio otros factores claves que permitan obtener un mayor porcentaje de células comprometidas hacia dicho linaje.
10. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, en general indican que la metodología usada permitió el aislamiento de células con características de células madre mesenquimales y su inducción hacia linajes de origen mesodérmico, ofreciéndonos resultados satisfactorios y el cumplimiento en su totalidad de los objetivos planteados.

9. RECOMENDACIONES

- 1 Realizar estudios comparativos del potencial de diferenciación de las células con características de células madre provenientes del estroma de la membrana amniótica de roedores y humanos, a fin de evaluar la variación de las modificaciones epigénicas entre estas.
- 2 Realizar determinaciones inmunocitoquímicas con marcadores específicos existentes en las células de morfología fusiforme, en las células con morfología cuboidal y en las de amplio volumen citoplasmático, con el propósito de plantear posibles métodos de separación y selección temprana, entre poblaciones celulares presentes en cultivos provenientes de la membrana amniótica.
- 3 Ampliar los ensayos de caracterización celular, incluyendo determinaciones inmunocitoquímicas con mayor número de marcadores específicos de superficie expresados en células troncales de naturaleza mesenquimal, las cuales podrían ser evaluadas además, por medio de citometría de flujo, inmunocitoquímica óptica, confocal y electrónica, cromatografía de inmunoafinidad o perlas magnéticas. También se podrían incluir análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión.
- 4 Ensayar los efectos de otros factores solubles inductores reportados tales como el BMP-4, TGF- β -1 y ASP, capaces de ejercer diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, respectivamente.
- 5 Ensayar otros métodos inductores de la diferenciación *in vitro* usando diferentes sistemas de cultivo, tales como sistema de micromasas celulares con matrices naturales y/o artificiales, co – cultivos, cultivo sobre feeder layer o con medio condicionado.
- 6 Ampliar los ensayos de evaluación de la diferenciación celular mediante el uso de marcadores específicos para determinar la presencia de colágeno tipo I y II, agregán y triglicéridos. También pueden realizarse análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión y determinación de la expresión de genes específicos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Acosta, A. 2003. Cultivo de Células del Estroma de la Médula Ósea de Rata y su Potencial de Diferenciación *in Vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 2 Adams, J., Watt, F. 1993. Regulation of Development and Differentiation by the Extracellular Matrix. *Development*. 117: 1183-1198.
- 3 Alaminos, M., Sanchez, M., Muñoz, J., García, J., Crespo, P., González, M., Campos, A. 2007. Evaluation of the Viability of Cultured Corneal Endothelial Cells by Quantitative Electron Probe X-ray Microanalysis. *J. Cell Physiol.* **211**: 692-698.
- 4 Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G. y colaboradores. 2007. Term Amniotic Membrane is a High Throughput Source for Multipotent Mesenchymal Stem Cells with the Ability to Differentiate into Endothelial Cells *in Vitro*. *BMC Dev. Biol.* **7**: 1-14.
- 5 Amri, E., Dani, C., Doglio, A., Etienne, J., Gnmaldi, P., Ailhaud, G. 1986. Adipose Cell Differentiation: Evidence for a Two-Step Process in the Polyamine-Dependent. Ob/1754 Clonal Line. *Biochem.* **238**: 115-22.
- 6 Araos, C. 2008. Cultivo de Células Madre Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano. Potencialidad Ósteo-Condrogénica "in Vitro". Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 7 Arbós, D. Crear Órganos Humanos, el Reto en Bioingeniería. [En línea]. 2004. http://www.semer.org/area_seme/actualidad_articulo.php?id=597. [Consulta: 17 de Agosto de 2011].
- 8 Arévalo, J., Páez, D., Rodríguez, V. 2007. Células Madre Mesenquimales: Características Biológicas y Aplicaciones Clínicas. *Cienc. Bioméd.* **5**: 101-212.

- 9 Bailo, M., Soncini, M., Vertua, E., Signoroni, P., Sanzone, S., Lombardi, G., Arienti, D. 2004. Engraftment Potential of Human Amnion and Chorion Cells Derived from Term Placenta. *Transplantation*. **78**: 1439-1448.
- 10 Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M. 2008. Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. **17**: 1095-1108.
- 11 Behzad F., Dickinson M., Charlton A., Aplin, J. 1994. Sliding Displacement of Amnion and Chorion Following Controlled Laser Wounding Suggests a Mechanism of Short Term Sealing of Ruptured Membranes. *Placenta*. **15**: 775-778.
- 12 Beresford, J., Bennett, J., Devlin, C., Leboy, P., Owen, M. 1992. Evidence for a Relationship Between the Differentiation of Adipocytic and Osteogenic Cells in Rat Marrow Stromal Cells Cultures. *J. Cell. Sci*. **102**: 341-351.
- 13 Beyer, N., Da Silva, L. 2006. Mesenchymal Stem Cells: Isolation *in Vitro* Expansion and Characterization. *Handb. Exp. Pharmacol*. **174**: 249-282.
- 14 Bianco, P., Gehron, P., Simmons, P. 2008. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Stem Cells*. **2**: 313-319.
- 15 Bieback, K. 2008. Basic Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus. Med. Memother*. **35**: 151-152.
- 16 Bilic, G., Zeisberger, S., Mallik, A., Zimmermann, R., Zisch, A. 2008. Comparative Characterization of Cultured Human Term Amnion Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells for Application in Cell Therapy. *Cell Transplant*. **17**: 955-968.
- 17 Blanco, F., Cañete, J., Pablos, J. 2007. Monografías SER. Técnicas de Investigación Básica en Reumatología. Editorial Médica Panamericana, Primera Edición. Madrid, España.

- 18 Bobis, S., Jarocha, D., Majka, M. 2006. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics and Clinical Applications. *Folia Histochem. Cytobiol.* **44**: 215-230.
- 19 Boeuf, S., Richter, W. 2010. Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells: Role of Tissue Source and Inducing Factors. *Stem Cell Res. Ther.* **1**: 31-41.
- 20 Bourne G. 1960. The Microscopic Anatomy of the Human Amnion and Chorion. *Obstet. Gynecol.* **79**: 1070-1073.
- 21 Brinchmann, J. 2008. Expanding Autologous Multipotent Mesenchymal Bone Marrow Stromal Cells. *Cytotherapy.* **14**: 320-330.
- 22 Brzoska, G., Kanahe, C., Carmeli, C., Von Schaell, D., Barde, Y., Kalcheim, C. 1995. Epithelial Mesenchymal Conversion of Dermatome Progenitors Requires Neural Tube-Derived Signals: Characterization of the role of Neurophin-3. *Development.* **121**: 2583-2594.
- 23 Cabero, L., Saldívar, D., Cabrillo, E. 2007. Obstetricia y Medicina Materno – Fetal. Editorial Médica Panamericana, Primera Edición. Madrid, España.
- 24 Calderón, D. 2007. Establecimiento del Cultivo de Células Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano y Estudio de su potencialidad de Diferenciación *in Vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- 25 Campos, A. 2004. Cuerpo, Histología y Medicina: Descripción Microscópica de la Ingeniería Tisular. Instituto de la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, España.
- 26 Caplan, A., Bruder, S. 2001. Mesenchymal Stem Cells: Building Blocks for Molecular Medicine in the 21st Century. *Trends Mol. Med.* **7**: 259-264.

- 27 Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., Troyer, D. 2006. Expression of Early Transcription Factors Oct4, Sox2 and Nanog by Porcine Umbilical Cord (PUC) Matrix Cells. *Reprod. Biol. Endocrin.* **4**: 8-21.
- 28 Cargnoni, A., Di Marcelo, M., Campagnol, M., Nassuato, C., Albertini, A., Parolini, O. 2009. Amniotic Membrane Patching Promotes Ischemic Rat Heart Repair. *Cell Transplant.* **18**: 1147-1159.
- 29 Casey, M., Word, R., MacDonald, O. 1991. Endothelin-1 Gene Expression and Regulation of Endothelin mRNA and Protein Biosynthesis in Avascular Human Amnion. Potential Source of Amniotic Fluid Endothelin. *J. Biol. Chem.* **266**: 5762-5768.
- 30 Céspedes, E., Reyes, A. 2007. Marcadores de Estrés Oxidativo en Ratas Senescentes. *Rev. Cubana Invest. Bioméd.* **26**: 15-25.
- 31 Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. 2007. Concise Review. Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells.* **25**: 2739-2749.
- 32 Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell.* **113**: 643-655.
- 33 Cheng, S., Yang, J., Rifas, L., Zhang, S., Avioli, L. 1994. Differentiation of Human Bone Marrow Osteogenic Stromal Cells *In Vitro*: Induction of the Osteoblast Phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology.* **134**: 277-286.
- 34 Clynes, M. 1998. *Animal Cell Culture Techniques*. Editorial Springer, Primera Edición. Michigan, USA.
- 35 Cohnheim, J. 1867. Über Entzündung und Eiterung. *Archiv. Virchow.* **40**: 1-79.

- 36 Cornelius, P., McDougald, O., Lane, M. 1994. Regulation of Adipocyte Development. *Annu. Rev. Nutr.* **14**: 99-129.
- 37 Crisan, M., Chen, C., Corselli, M., Andriolo, G., Lazzari, L., Péault, B. 2008. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Stem Cells.* **3**: 301–313.
- 38 Davis, J. 2011. *Animal Cell Culture: Essential Methods*. Editorial Wiley – Blackwell, Primera Edición. Hertfordshire, UK.
- 39 De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M., Xu, T., Santos, C., Perin, L. y col. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for Therapy. *Nat. Biotechnol.* **25**: 100-106.
- 40 Díaz, S., Muiños, E., Hermida, T., Rendal, M., Fuentes, I., de Toro, F., Blanco, F. 2007. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. *Tissue Engineering.* **17**: 49-59.
- 41 Díaz, S., Muiños, E., Hermida, T., Rendal, M., Fuentes, I., De Toro, F., Blanco, F. 2010. Multilineage Differentiation Potential of Cells Isolated from the Human Amniotic Membrane. *J. Cell Biochem.* **111**: 846-57.
- 42 Díaz, S., Muiños, E., Hermida, T., Cicione, C., Rendal, M., Fuentes, I., De Toro, F., Blanco, F. 2011. Human Amniotic Membrane as an Alternative Source of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Differentiation.* **81**: 162-171.
- 43 Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. y colaboradores. 1995. A Biomarker that Identifies Senescent Human Cells in Culture and In Ageing Skin *In Vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 9363-9367.
- 44 Dobreva, M., Pereira, P., Deprest, J., Zwijsen, A. 2010. On the Origin of Amniotic Stem Cells: of Mice and Men. *Int. J. Dev. Biol.* **54**: 761-777.

- 45 Dominici, M., Le Blanc, K., Muller, I. 2006. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cell. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. **8**: 315-317.
- 46 Estrada, R., Venegas, P. 2007. Comparación de Diferentes Protocolos para el Cultivo de Células Madre Mesenquimales de Origen Adiposo. *Rev. Costarricense Cienc. Méd.* **28**: 21-28.
- 47 Eynard, A., Valentich, M., Rovasio, R. 2008. Histología y Embriología del Ser Humano. Editorial Médica Panamericana, Cuarta Edición. Buenos Aires, Argentina.
- 48 Farmer, S. 2006. Transcriptional Control Adipocyte Formation. *Cell Metab.* **4**: 263-273.
- 49 Fernandes, M., Sridhar, M., Sangwan, V., Rao, G. 2005. Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. *Cornea*. **24**: 643-653.
- 50 Ferreira, S., Jadao, S., Furlotti, A. Historia de las Células: Células Madre. [En línea]. 2007. http://www.dialogica.com.ar/medline/2007/09/celulas_madre.html. [Consulta: 3 de Septiembre de 2011].
- 51 Fisher, S., Cui, L., Zhang, K., Grahl, Z., GuoYang, J., Tarpey, C., Damsky, H. 1989. Adhesive and Degradative Properties of the Human Placental Cytotrophoblast Cells in Vitro. *J. Cell Biol.* **109**: 891-902.
- 52 Flores, E., Montesinos, J., Mayani, H. 2006. Células Troncales Mesenquimales: Historia, Biología y Aplicación Clínica. *RIC*. **58**: 498-511.
- 53 Fontenla, J., Vázquez, X., Díaz, P., Gatell, J., Pita, D. 2008. Membrana Amniótica. Características, Efectos y Aplicaciones en Oftalmología. *Ciencia, Tecnología y Medicina*. **1465**: 587-602.
- 54 Forbes, S., Vig, P., Poulosom, R., Wright, N., Alison, M. 2002. Adult Stem Cell Plasticity: New Pathways of Tissue Regeneration Become Visible. *Clin. Sci.* **103**: 355-369.
- 55 Franceschi, R., Lyer, B., Cui, Y. 1994. Effects of Ascorbic Acid on Matrix Formation and Osteoblast Differentiation in Murine mc3t3-e1 Cells. *J. Bone Miner. Res.* **9**: 843-854.

- 56 French, J., McGregor J. 1996. The pathobiology of Premature Rupture of Membranes. *Sem. Perinatol.* **20**: 344-368.
- 57 French, K., Burggren, W., Randall, D. 1998. Eckert. Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones. Editorial McGraw Hill Interamericana, Cuarta Edición. Madrid, España.
- 58 Freshney, I. 2000. Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique. Editorial Wiley-Liss, Cuarta Edición. Toronto, Canadá.
- 59 Friedenstein, A. Gorskaja, J., Kulagina, N. 1974. Precursors for Fibroblasts in Different Populations of Hematopoietic Cells as Detected by the in Vitro Colony Assay Method. *Exp. Hematol.* **2**: 83-92.
- 60 Friedenstein, A. 1990. Osteogenic Stem Cells in Bone Marrow. *JBMR.* **7**: 243–272.
- 61 Fuentes, M. 2008. Optimización del Sistema de Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a Partir de Médula Ósea Humana. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- 62 García, J., Pico, P., Rojas, E. 2006. Temario. Técnico Especialista en Anatomía Patológica. Editorial MAD, Volumen 2. País Vasco, España.
- 63 Geneser, F. 1993. Histología. Editorial Médica Panamericana, Segunda Edición. Buenos Aires, Argentina.
- 64 Gil, P. 2007. Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Editorial Visión Libros, Primera Edición. Madrid, España.
- 65 Gilbert, S. 2006. Biología de Desarrollo. Editorial Médica Panamericana, Séptima Edición. Buenos Aires, Argentina.
- 66 Gimble, J., Katz, A., Bunnell, B. 2007. Adipose – Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ. Res.* **100**: 1249-1260.

- 67 Giraldo, J., Madero, J., Ávila, M., Cuneo, S., López, C., Escobar, M., Aparicio, A., y colaboradores. 2003. Las Células Madre. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. **54**: 87-96.
- 68 Goldman, R., Khuon, S., Chou, Y., Opal, P., Steinert, P. 1996. The Function of Intermediate Filaments in Cell Shape and Cytoskeletal Integrity. *J. Cell. Biol.* **134**: 971-983.
- 69 Goncalves, R., Da Silva, C., Cabra, J., Zanjani, E., Almeida, G. 2006. STRO-1+ Human Universal Stromal Feeder Layer to Expand/Maintain Human Bone Marrow Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in a Serum-Free Culture System. *Exp. Hematol.* **34**: 1353-1359.
- 70 Guilak, F., Fermor, B., Gimple, M. 2003. Oxygen Key Switch Transforming Adult Stem Cells From Fat Into Cartilage. *Clin. Orthop.* **412**: 196-212.
- 71 Grant, M., May, W., Caballero, S., Brown, G., Guthrie, S., Mames, R., Byrne, B. y colaboradores. 2002. Adult Hematopoietic Stem Cells Provide Functional Hemangioblast Activity During Retinal Neovascularization. *Nat. Med.* **8**: 607-12.
- 72 Greider, C., Blackburn, E. 1989. A telomeric Sequence in the RNA of Tetrahymena Telomerase Required for Telomere Repeat Synthesis. *Nature*. **337**: 331-337.
- 73 Grogan, S., Barbero, A., Díaz, J., Cleton, A., Soeder, S. 2007. Identification of Markers to Characterize and Sort Human Articular Chondrocytes with Enhanced *In Vitro* Chondrogenic Capacity. *Arthr. Rheum.* **56**: 586–95.
- 74 Hall, B. 2005. Bones and Cartilage: Developmental Skeletal Biology. Editorial Hard – Bound, Primera Edición. Canada.
- 75 Hamade, E., Azzar, G., Radisson, J., Buchet, R., Roux, B. 2003. Chick Embryo Anchored Alkaline Phosphatase and Mineralization Process *in Vitro*. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2082-2090.

- 76 Helgason, C., Miller, C. 2005. *Methods in Molecular Biology*. Editorial Human Press, Tercera Edición.
- 77 Herrero, L. 2004. *Procedimientos en Virología Médica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica, Costa Rica.
- 78 Ho, A., Wagner, W., Franke, W. 2008. Heterogeneity of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Cytotherapy*. **14**: 320-330.
- 79 Holt, S., Wright, W., Shay, J. 1997. Multiple Pathway for the Regulation of Telomerase Activity. *Eur. J. Cancer*. **33**: 761-766
- 80 Ibarra, C., Garciadiego, D., Martínez, V., Velasquillo, C. 2007. Ingeniería de Tejidos y Osteoartritis. *Reumatology Clinical*. **3**: 19-23.
- 81 Ilancheran, S., Moodley, Y., Manuelpillai, U. 2009. Human Fetal Membranes: a Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair?. *Placenta*. **30**: 2-10.
- 82 In't Anker, P., Scherjon, S., Kleijburg, C., De Groot, G., Claas, F., Fibbe, W., Kanhai, H. 2004. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*. **22**: 1338-1345.
- 83 Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., Kato, Y. 2005. Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells From Fibroblasts. *Biochem. Bioph. Res. Commun*. **332**: 297-303.
- 84 Jaime, J. 2001. Biología del Sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) y su Importancia en Trasplantes. *Med. Univer*. **3**: 149.152.
- 85 Jaiswal, N., Haynesworth, S., Caplan, A., Bruder, S. 1997. Osteogenic Differentiation of Purified Culture-Explant Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *J. Cell Biochem*. **64**: 295-312.

- 86 Janderová, L., McNeil, M., Murrel, A., Mynatt, R., Smith, S. 2003. Human Mesenchymal Stem Cells as an In Vitro Model for Human Adipogenesis. *Obs. Res.* **11**: 65-73.
- 87 Jiang Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C. 2002a. Multipotent Progenitor Cells Can Be Isolated from Postnatal Murine Bone Marrow, Muscle, and Brain. *Exp. Hematol.* **30**: 896-904.
- 88 Jiang, Y., Jahagirdar, B., Reinhardt, R. 2002b. Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Marrow. *Nature.* **418**: 41-49.
- 89 Jingushi, S., Heydemann, A., Kana, S., Macey, L., Bolander, M. 1990. Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) Injection Stimulates Cartilage Enlargement and inhibits Cartilage Gene Expression in Rat Fracture Healing. *J. Orthop. Res.* **8**: 364-371.
- 90 Jones, E. 2003. Lo Esencial en Celular y Genética. Editorial Diorki Servicios Integrales, Segunda Edición. Elsevier, España.
- 91 Kakishita, K., Nakao, N., Sakuragawa, N., Itakura, T. 2003. Implantation of Human Amniotic Epithelial Cells Prevents the Degeneration of Nigral Dopamine Neurons in Rats with 6-Hydroxydopamine Lesions. *Brain Res.* **980**: 48-56.
- 92 Keating, A. 2006. Mesenchymal Stromal Cells. *Curr. Opin. Hematol.* **13**: 419-425.
- 93 Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K. 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* **24**: 1294-1301.
- 94 Kim, S., Kaminker, P., Campisi, J. 2002. Telomeres, Aging and Cancer: In Search of Happy Ending. *Oncogene.* **21**: 503-511.

- 95 Kim, S., Song, C., Shon, S., Lee, K., Kim, C., Lee, M., Wang, L. 2009. Effects of Human Amniotic Membrane Grafts Combined with Marrow Mesenchymal Stem Cells on Healing of Full-Thickness Skin Defects in Rabbits. *Cell Tissue Res.* **336**: 59-66.
- 96 Kim, S., Song, C., Shon, S., Lee, K., Kim, C., Lee, M., Wang, L. 2009. Effects of Human Amniotic Membrane Grafts Combined with Marrow Mesenchymal Stem Cells on Healing of Fullthickness Skin Defects in Rabbits. *Cell Tissue Res.* **336**: 59-66.
- 97 Knight, M., Evans, G. 2004. Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Plast. Reconstr. Surg.* **114**: 26E-37E.
- 98 Kobayashi, M., Yakuwa, T., Sasaki, K., Sato, K., Kikuchi, A., Kamo, I., Yokoyama, Y. 2008. Multilineage Potential of Side Population Cells from Human Amnion Mesenchymal Layer. *Cell Transplant.* **17**: 291-301.
- 99 Koolman, J., Röhm, K. 2005. Color Atlas of Biochemistry. Editorial Thieme, Segunda Edición. Augsburg, Alemania.
- 100 Krampera, M., Pasini, A., Pizzolo G., Cosmi L., Romagnani, S., Annunziato, F. 2006. Regenerative and Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**: 435-441.
- 101 Kuske, B., Savkovic, V., zur Nieden, N. 2011. Improved Media Compositions for the Differentiation of Embryonic Stem Cells into Osteoblasts and Chondrocytes. *Methods Mol. Biol.* **690**: 195-215.
- 102 Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S., Ringden, O. 2003. Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand. J. Immunol.* **57**: 11-20.
- 103 Lee, J., Parrett, B., Conejero, J., Laser, J., Chen, J., Kogon, A., Nanda, D., Grant, R., Breitbart, A. 2003. Biological Alchemy: Engineering Bone and Fat From Fat-Derived Stem Cells. *Annu. Plast. Surg.* **50**: 610-617.

- 104 Lehmann, J., Lenhard, J., Oliver, B., Ringold, G., Kliewer, S. 1997. Peroxisome Proliferator – Activated Receptors α and γ are Activated by Indomethacin and Other Non – Steroidal Anti – Inflammatory Drugs. *J. Biol. Chem.* **272**: 3406-3410.
- 105 Lev, R., Spicer, S. 1964. Specific Staining of Sulfate Group with Alcian Blue at Low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 309-314.
- 106 Li, L., Xie, T. 2005. Stem Cells Niche: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**: 605-631.
- 107 Linju, B., Huang, H., Chien, C., Jui, H., Ko, B., Yao, M., Shun, C. y colaboradores. 2005. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells.* **23**: 3–9.
- 108 López, F., Tiravanti, B. 2011. Técnica de Obtención Ambulatoria de Células Madre a partir del Tejido Adiposo. Tesis de Maestría. CrioSave, Bélgica.
- 109 Madigan, M., Martinko, J., Parket, J. 1997. Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall, Octava Edición. Madrid, España.
- 110 Maillet, M. 2003. Manual de Biología Celular. Editorial Masson, Primera Edición. Barcelona, España.
- 111 Marcus, A., Coyne, T., Rauch, J., Woodbury, D., Negro, I. 2008. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation.* **76**: 130-144.
- 112 Martin, E., Watt, S. 2003. Stem Cell Plasticity. *Br. J. Haematol.* **122**: 877-891.
- 113 Martínez, R., Gragera, R. 2008. Fundamentos Teóricos y Prácticos de la Histoquímica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.
- 114 Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2003. Bioquímica. Editorial Pearson Addison – Wiley, Tercera Edición. Madrid, España.

- 115 Meller, D., Pires, R., Mack, R., Figueiredo, F., Heiligenhaus, A., Park, W., Prabhasawat, P. y colaboradores. 2000. Amniotic Membrane Transplantation for Acute Chemical or Thermal Burns. *Ophthalmology*. **107**: 980-9.
- 116 Mendes, S., Robin, C., Dzierzak, E. 2005. Mesenchymal Progenitor Cells Localize within Hematopoietic Sites Throughout Ontogeny. *Development*. **132**: 1127-1136.
- 117 Mercé, L. 2009. Células Madre: Preguntas y Respuestas sobre la Donación y Conservación de Sangre de Cordón Umbilical. Editorial Médica Panamericana, Primera Edición. Madrid, España.
- 118 Merentes, E. 2009. Fuentes de Obtención de Células Madre Mesenquimales. Potencialidad de Diferenciación *in Vitro*. Trabajo de Ascenso a Titular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V. Caracas, Venezuela.
- 119 Meyer, M., Merentes, E. 2011a. Aislamiento y Establecimiento del Cultivo de Células Mesenquimales de la Membrana Amniótica. III Congreso de la Escuela de Bioanálisis – UCV. Caracas, Venezuela.
- 120 Meyer, M., Merentes, E., Márquez, M. 2011b. Aislamiento, Establecimiento y Caracterización del Cultivo de Células Madre Mesenquimales de la Membrana Amniótica. Congreso Estudiantil de Investigación y Desarrollo Científico. Caracas, Venezuela.
- 121 Meyer, M., Merentes, E. 2011c. Aislamiento, Establecimiento y Caracterización del Cultivo de Células Madre Mesenquimales del Estroma de la Membrana Amniótica de Fetos de Ratón. Informe de Postulación. Premio al Mérito Estudiantil 2011, Mención Investigación. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 122 Meyer, M., Merentes, E., Márquez, M. 2011d. Establecimiento de las Condiciones Óptimas para el Mantenimiento, Proliferación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales de la Membrana

Amniótica de Fetos de Ratón. LXI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia - Capítulo Aragua. Maracay, Venezuela.

- 123 Mihi, C., Rus Ciucă, D., Soritău, O., Şuşman, S., Mihi, D. 2009. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from the Amniotic Membrane. *J. Morphol. Embryol.* **50**: 73-77.
- 124 Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D., Strom, S. 2005. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells.* **23**: 1549–1559.
- 125 Ming-Song, T., Lee, J., Chang, Y., Hwang, S. 2004. Isolation of Human Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Second-Trimester Amniotic Fluid Using a Novel Two-Stage Culture Protocol. *Hum. Reprod. Embryol.* **19**: 1450-1456.
- 126 Minguell, J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal Stem Cells. *Exp. Biol. Med.* **226**: 507-520.
- 127 Mitsiadis, T., Barradon, O., Rochat, A., Barrandon, Y., De Bari, C. 2007. Stem Cell Niches in Mammals. *Exp. Cell Res.* **313**: 3377-3385.
- 128 Miura, Y., Fitzsimmons, J., Commisso, C., Gallay, S., O'Driscoll, S. 1994. Enhancement of Periosteal Chondrogenesis *in Vitro*. *Clin. Orthop.* **301**: 271-280.
- 129 Montuenga, L., Esteban, F., Calvo, A. 2009. Histología y Biología Celular. Editorial ELSEVIER MASSON, Primera Edición. Barcelona, España.
- 130 Moore, K., Persaud, T. 2009, Embriología Clínica. Editorial Elsevier Saunders, Octavo Edición. Barcelona, España.
- 131 Morel, G., Cavalier, A., Caballero, T., Gallego, R. 2000. Hibridación *in Situ* en Microscopía Óptica. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. Santiago de Compostela, España.

- 132 Morgan, S., Darling, D. 1995. Cultivo de Células Animales. Editorial Acribia, Parte I. Michigan, USA.
- 133 Morton, K., Dewhurst, C. 1986. Human Amnion in the Treatment of Vaginal Malformations. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **93**: 50-54.
- 134 Muiños, E. 2010. La Membrana Amniótica Humana: Caracterización de las Células Madre y su Aplicación en Terapia Celular para Reparar Lesiones de Cartilago Articular Humano. Tesis Doctoral. Universidad Da Coruña. Santiago de Compostela, España.
- 135 Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. 2000. Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in vitro according to a hierarchical Model. *J. Cell Sci.* **113**: 1161-1166.
- 136 Nagy, A., Gócza, E., Merentes, E., Prideaux, V., Iványi, E., Markklla, M., Rossant, J. 1990. Embryonic Stem Cells Alone are Able to Support Fetal Development in the Mouse. *Development.* **110**: 815-821.
- 137 Naughton, G. 2002. From Lab Bench to Market: Critical Issues in Tissue Engineering. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**: 372-385.
- 138 Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, A. 2008. Properties of the Amniotic Membrane for Potential use in Tissue Engineering. *Eur. Cells Mater.* **15**: 88-99.
- 139 Parry, S., Strauss, J. 1998. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *N. Engl. J. Med.* **338**: 663-670.
- 140 Peng, Z., Hirohiko, I., Minoru, H., Masao, O., Ikuo, K., Toshio, N. 2005. Human Amniotic Mesenchymal Cells Have Some Characteristics of Cardiomyocytes. *Transplantation.* **9**: 528-535.
- 141 Peris, J., Prat, J., Dejoz, R., Comin, M., Atienza, C., Barreda, J., Roger, I. y colaboradores. 2006. Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs): Efecto de la Proteína Osteogénica -1 (OP - I/ BMP - 7) en la Condrogénesis y Osteogénesis. *Rev. Esp. Cir. Osteoart.* **31**: 37-48.

- 142 Phillips, J., Gersbach, C., Wojtowicz, A., García, A. 2006. Glucocorticoid – Induced Osteogenesis is Negatively Regulated by Runx2/cbfa1 Serine Phosphorylation. *J. Cell. Sci.* **119**: 581-591.
- 143 Pineda, C., Londoño, C. 2009. Obtención de Células Madre del Tejido Adiposo y su Potencial de Diferenciación Osteogénico. *Rev. Ing. Bioméd.* **3**: 58-65.
- 144 Pitterger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* **284**: 143-147.
- 145 Prowse, K., Greider, C. 1995. Developmental and Tissue-Specific Regulation of Mouse Telomerase and Telomere Length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4818-2482.
- 146 Prophet, E., Millis, B., Arrington, J., Sobin, L. 1995. Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington D.C., E.U.A.
- 147 Prósper, F. 2004. Células Madre Adultas. *J. Cardiovascular Risk Fact.* **13**: 11-18.
- 148 Prósper, F. 2006. Trasplante Celular y Terapia Regenerativa con Células Madre. *An. Sist. Sanit. Navar.* **29**: 219-234.
- 149 Quiroz, G., Posada, O., Gallego, D., Higueta, N., Sarassa, C., Hansford, D., Agudelo, P., López L. 2008. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Evaluation of Their Osteogenic Potential. *Rev. Ing. Bioméd.* **2**: 48-55.
- 150 Radisky, D., La Barge, M. 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype. *Stem Cells.* **2**: 511-512.
- 151 Raff, M. 2003. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artefact?. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 1-22.

- 152 Reubinoff, B., Pera, M., Fong, C., Trounson, A., Bongso, A. 2000. Embryonic Stem Cell Lines from Human Blastocysts: Somatic Differentiation "in Vitro". *Nat. Biotechnol.* **18**: 399-404.
- 153 Riaño, N., Vera, V., Villamil, L. 2007. Las Células Madres Mesenquimales desde la Perspectiva de las Ciencias Veterinarias. *Med. Veter.* **13**: 19-26.
- 154 Rinastiti, M., Harijadi, S., Santoso, A., Sosroseno, W. 2006. Histological Evaluation of Rabbit Gingival Wound Healing Transplanted with Human Amniotic Membrane. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **35**: 247-51.
- 155 Robertson, E. 1987. Embryo-Derived Stem Cell Lines. In *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- 156 Rodríguez, M. 2005. Establecimiento del Cultivo de Células del Estroma de Tejido Adiposo de Rata y su Potencialidad Ósteo-Condrogénica *in Vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 157 Rodríguez, L., Alfonso, Z., Zhang, R., Leung, J., Wu, B., Ignarro, L. 2006. Clonogenic Multipotent Stem Cells in Adipose Tissue Differentiate into Functional Smooth Muscle Cells. *PNAS.* **103**: 12167-12172.
- 158 Rodríguez, M. 2010. Estudio Comparativo del Potencial de Diferenciación hacia el Linaje Epitelial de las Células Mesenquimales Provenientes del Tejido Adiposo de Ratón y Humano. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 159 Rodríguez, V., Fuentes, M., Aristizabal, J., Vernot, J. 2011. Aislamiento y Caracterización de Células "Stem" Mesenquimales de Médula ósea Humana según Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Scientiarum.* **15**: 224-239.
- 160 Rosen, E. 2006. Transcriptional Control of Adipocyte Formation. *Cell Metab.* **4**: 263-273.

- 161 Ross, M., Pawlina, W. 2007. Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición. Madrid, España.
- 162 Rubio, D., García-Castro, J., Martín, M., De la Fuente, R., Cigudosa, J., Lloyd, A., Bernad, A. 2005. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Prevent.* **65**: 8.
- 163 Rus, H., Cudrici, C., Niculescu, F. 2005. The Role of the Complement System in Innate Immunity. *Immunologic Research* **33**: 103–112.
- 164 Ryan, J., Barry, F., Murphy, J., Mahon, B. 2005. Mesenchymal Stem Cells Avoid Allogeneic Rejection. *J. Inflamm.* **2**: 8-15.
- 165 Sadler, T. 2006. Langman. Embriología Médica: Con Orientación Clínica. Editorial Médica Panamericana, Novena Edición. Buenos Aires, Argentina.
- 166 Sakuragawa, N., Misawa, H., Ohsugi, K., Kakishita, K., Ishii, T., Thangavel, R., Tohyama, J. y colaboradores. 1997. Evidence for Active Acetylcholine Metabolism in Human Amniotic Epithelial Cells: Applicable to Intracerebral Allografting for Neurologic Disease. *Neurosci. Lett.* **232**: 53-56.
- 167 Salas, J. 2010. Obtención de Cardiomiocitos a partir de CMMO: Evaluación de la Diferenciación y Funcionalidad para su Utilización en Cultivos en 3D. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.
- 168 Sangwan, V., Burman, S., Tejwani, S., Mahesh, S., Murthy, R. 2007. Amniotic Membrane Transplantation: a Review of Current Indications in the Management of Ophthalmic Disorders. *Indian. J. Ophthalmol.* **55**: 251-260.
- 169 Sankar, V., Muthusamy, R. 2003. Role of Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation in Spinal Cord Injury Repair Research. *Neuroscience.* **118**: 11-17.

- 170 Santos, M., Gomes, J., Hofling, A., Rizzo, L., Romano, A., Belfort, R. 2005. Survival Analysis of Conjunctival Limbal Grafts and Amniotic Membrane Transplantation in Eyes with Total Limbal Stem Cell Deficiency. *Am. J. Ophthalmol.* **140**: 223-230.
- 171 Scadden, D. 2006. The Stem Cell Niche as an Entry of Action. *Nature.* **441**: 1075-1079.
- 172 Shimmura, S., Tsubota, K. 2002. Ocular Surface Reconstruction Update. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **13**: 213-219.
- 173 Schuldiner, M., Yanuka, O., Eldor, J., Melton, D., Benvenisty, N. 2000. Effects of Eight Growth Factors on the Differentiation of Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Dev. Biol.* **97**: 11307-11312.
- 174 Seyedin, S., Thompson, A., Bentz, H., Rosen, D., Mc Pherson, J., Conti, A. 1986. Cartilage - Inducing Factor - A. Apparent Identity to Transforming Growth Factor - β . *J. Biol. Chem.* **261**: 5693-5695.
- 175 Sharp, J. 1980. Introducción al Cultivo de Tejidos Animales. Editorial Omega, Segunda Edición. Barcelona, España.
- 176 Sierra, R. 1991. Inmunocitoquímica: Marcadores Epiteliales. Trabajo Presentado en el V Congreso Venezolano de Dermatología. Caracas, Venezuela.
- 177 Smith, P., Wise, L., Berkowitz, R., Wan, C., Rubin, C. 1988. Insulin-Like Growth Factor is an Essential Regulator of the Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 9402-9408.
- 178 Spinelli, O., Vinay, C. 1996. Apoptosis: Una Forma Diferente de Morir. *Pren. Med. Argent.* **83**: 263-271.
- 179 Spivakov, M., Fisher, A. 2007. Epigenetic Signatures of Stem-Cell Identity. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 263-271.
- 180 Student, A., Hsu, R., Lane, M. 1980. Induction of Fatty Acid Synthetase Synthesis in Differentiating 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **255**: 4745-4750.

- 181 Schneider, R., Neuss, S., Stainforth, R., Laddach, N., Bovi, M., Knuechel, R., Perez, A. 2008. Three-Dimensional Epidermis-Like Growth of Human Mesenchymal Stem Cells on Dermal Equivalents: Contribution to tissue Organization by Adaptation of Myofibroblastic Phenotype and Function. *Differentiation*. **76**: 156-167.
- 182 Sueblinvong, V., Loi, R., Eisenhauer, P., Bernstein, I., Suratt, B., Spees, J., Wiss, D. 2007. Derivation of Lung Epithelium from Human Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**: 701-711.
- 183 Taleisnik, S. 2006. Receptores Celulares y la Transducción de Señales. Temas de Biología Celular. Editorial Encuentro Grupo Editor, Primera Edición. Córdoba, Argentina.
- 184 Tamagawa, T., Ishiwata, I., Saito, S. 2004. Establishment and Characterization of a Pluripotent Stem Cell line Derived from Human Amniotic Membranes and Initiation of Germ Layers *in Vitro*. *Hum. Cell.* **17**: 125-130.
- 185 Tan, S., Sulaiman, S., Pinguan-Murphy, B., Selvaratnam, L., Tai, C., Kamarul, T. 2011. Human Amnion as a Novel Cell Delivery Vehicle for Chondrogenic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Tissue Bank.* **12**: 59-70.
- 186 Tejwani, S., Kolari, R., Sangwan, V., Rao, G. 2007. Role of Amniotic Membrane Graft for Ocular Chemical and Thermal Injuries. *Cornea.* **26**: 21-6.
- 187 Thomson, J., Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* **282**: 1145-1147.
- 188 Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., Nikaido, T. 2007. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J. Pharmacol. Sci.* **105**: 215-228.
- 189 Tse, W., Pendleton, D., Beyer, W., D'Andrea, A., Guinan, E. 2001. Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) Suppress T-Cell Activation Without Inducing Anergy. *Cytotherapy.* **3**: 417-721.

- 190 Tuan, R., Boland, G., Tuli, R. 2003. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell-Based Tissue Engineering. *Arthr. Res. Ther.* **5**: 32-45.
- 191 Urbaneja, M., Gugig, M., Bello, R. 1975. Cultivo de Tejidos Animales. Trabajo de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 192 Verfaillie, C., Pera, M., Lansdorp, P. 2002. Stem Cells: Hype and Reality. *Haematologica. Jan.* **30**: 369-391.
- 193 Vico, M. 2009. Evaluación de la Viabilidad y Caracterización Genética de Células Endoteliales Transdiferenciadas a partir de Células Madre de la Gelatina de Wharton. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- 194 Viveros, C., Laviada, H., Bastarrachea, R. 2003. Influencia Endocrina y Paracrina sobre la Adipogénesis. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **10**: 151-164.
- 195 Watabe, T., Miyazono, K. 2009. Roles of TGF- β Family Signaling in Stem Cells Renewal and Differentiation. *Cell Res.* **22**: 1330-1337.
- 196 Weissman, I., Anderson, D., Gage, F. 2001. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Dev. Biol.* **17**: 387-403.
- 197 Weismann, H., Meyer, U. 2006. Bone and Cartilage Engineering. Editorial Springer. Estados Unidos.
- 198 Winslow, T. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. [En línea]. 2001. <http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project.../unrestricted/IQP.pdf>. [Consulta: 10 de Septiembre de 2011].
- 199 Wise, G., Frazier, S., D'Souza, R. 2000. Cellular Molecular and Genetic Determinants of Tooth Eruption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**: 323-334.

- 200 Xiao, G., Cui, Y., Ducy, P., Karsenty, G., Franceschi, R. 1997. Ascorbic Acid – Dependent Activation of the Osteocalcin Promoter in mc3t3-e1 Preosteoblasts: Requirement for Collagen Matrix Synthesis and the Presence of an Intact ose2 Sequence. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1103-1113.
- 201 Yang, L., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Xiuju, D., Tohyama, M., Hanakawa, Y., Hirakawa, S., y colaboradores. 2009. Living Skin Equivalent Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J. Dermatol. Sci.* **56**: 188-95.
- 202 Yu, J., Thomson, J. 2006. Embryonic Stem Cells. Regenerative Medicine 2006 National Institute of Health.
- 203 Zamudio, T. Regulación Juridicial de las Biotecnologías. Células Madre: Embrionarias y de Adulto. [En línea]. 2005. <http://www.biotech.bioetica.org/clase2-17.htm>. [Consulta: 28 de Agosto de 2011].
- 204 Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. 2002. Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cells.* **13**: 4279-4295.

11. APÉNDICES

11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular

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

Cloruro de Sodio (NaCl)	8 grs
Cloruro de Potasio (KCl)	0,2 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2,9 grs
Di-hidrógeno de Potasio Primario (KH_2PO_4)	0,2 grs
Agua Bidestilada Desionizada	1000 mL

11.1.2. Medio nutritivo (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL)

Sobre de Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO)	1
Suero Fetal Bovino (SFB)	100 mL
Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3)	3,7 grs
Gentamicina	625 μL [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]
Estreptomicina	400 μL [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]
Piruvato de Sodio	1 mM
Aminoácidos No Esenciales	1 mM
Agua Bidestilada Desionizada	1000 mL

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

Cloruro de Sodio (NaCl)	8 grs
Cloruro de Potasio (KCl)	4 grs
Di-sodio Hidrógeno Fosfato Dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0,1 grs
Glucosa Monohidratada	1 grs

Trizma-Base	3 grs
Rojo Fenol	0,06 grs
Penicilina G	4 grs
Tripsina	1 grs
Solución Buffer de Fosfato (PBS)	1000 mL

11.1.4. Solución de Colagenasa tipo V al 0,1% (Cantidades necesarias para preparar 10 mL)

Colagenasa tipo V	0,01 grs
Solución Buffer de Fosfato (PBS)	10 mL

11.1.5. Solución de Gelatina al 1% (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Gelatina	1 grs
Agua Bidestilada Desionizada	100 mL

11.1.6. Solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL)

Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	0,4 grs
Agua Bidestilada Desionizada	1000 mL

11.1.7. Soluciones STOCK de los Factores Solubles Ensayados (Cantidades necesarias para preparar 10 mL)

11.1.7.1. Ácido Ascórbico 1M

Ácido Ascórbico	1,76 grs
Solución Buffer de Fosfato (PBS)	10 mL

11.1.7.2. β -Glicerolfosfato 1M

β -Glicerolfosfato	3,1 grs
Agua Bidestilada Desionizada	10 mL

11.1.7.3. Isobutilmetilxantina 10mM

Isobutilmetilxantina	0,022 grs
Etanol	10 mL

11.1.7.4. Indometacina 10mM

Indometacina	0,036 grs
Etanol	10 mL

11.1.8. Medios Inductores Ensayados (Cantidades necesarias para preparar 25 mL)

11.1.8.1. Medio Osteogénico

Insulina Recombinante (STOCK 100UI/mL)	521 μ L [5 μ g/mL]
Ácido Ascórbico	7,1 μ L [50 μ g/mL]
Dexametasona (STOCK 2 mg/mL)	6,45 μ L [$1 \cdot 10^{-7}$ M]
β -Glicerolfosfato	250 μ L [10mM]
Medio Nutritivo	25 mL

11.1.8.2. Medio Condrogénico

Insulina Recombinante (STOCK 100UI/mL)	521 μ L [5 μ g/mL]
Ácido Ascórbico	7,1 μ L [50 μ g/mL]
Dexametasona (STOCK 2 mg/mL)	6,45 μ L [$1 \cdot 10^{-7}$ M]
Medio Nutritivo	25 mL

11.1.8.3. Medio Adipogénico

Insulina Recombinante (STOCK 100UI/mL)	1042 μ L [10 μ g/mL]
Dexametasona (STOCK 2 mg/mL)	64,55 μ L [$1 \cdot 10^{-6}$ M]
Isobutilmetilxantina	1250 μ L [0,5 mM]
Indometacina	500 μ L [0,2 mM]

Medio Nutritivo 25 mL

11.2. Soluciones fijadoras

11.2.1. Solución de Formalina neutral al 10% (Cantidades necesarias para preparar 100 mL)

Formaldehido al 37% 27 mL

Solución Buffer de Fosfato (PBS) 73 mL

11.2.2. Solución de Albúmina de Mayer (Cantidades necesarias para preparar 10 mL)

Clara de Huevo 5 mL

Glicerina 5 mL

Timol 2 mL

11.3. Soluciones colorantes (Cantidades necesarias para preparar 10 mL)

11.3.1. Solución de Rojo de Alizarina S al 2%

Rojo de Alizarina S..... 0,2 grs

Agua Bidestilada Desionizada 10 mL

Ajustar el pH a un rango de 4,1 – 4,3 usando ácido clorhídrico (HCL 1M)

11.3.2. Solución acuosa de Safranina O al 0,1%

Safranina O 0,01 grs

Agua Bidestilada Desionizada 10 mL

11.3.3. Solución de Fast Green al 0,001%

Fast Green FCF 0,0001 grs

Agua Bidestilada Desionizada 10 mL

11.3.4. Solución de Azul de Toluidina al 0,1%

Azul de Toluidina 0,01 grs

Agua Bidestilada Desionizada 10 mL

11.3.5. Solución de Azul Alcian pH 2,5

Azul Alcian 0,25 grs

Ácido Acético Glacial 0,75 mL

Agua Bidestilada Desionizada 24,25 mL

11.3.6. Solución de Sudan III al 0,2%

Sudan III 0,02 grs

Acetona 5 mL

Etanol al 70% 5 mL