

## MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO BIOSUSTRATO TRIDIMENSIONAL

*Eliana Navarro<sup>1</sup>, Elizabeth Merentes<sup>1</sup>, María Lorena Márquez<sup>1\*</sup> y  
Enrique González-Terán<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. <sup>2</sup>Clínica Cristóbal Rojas. \*lormarmar@gmail.com

### RESUMEN

La membrana amniótica humana (MAH) está formada por una capa epitelial de células cuboidales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Se sugiere que la matriz extracelular de la MAH y sus componentes, son un candidato excelente para utilizar como sustrato nativo en la ingeniería de tejidos. En este contexto y en función de los proyectos de investigación relacionados a la bioingeniería tisular que se han venido desarrollando en el laboratorio, se diseñó un sistema de cultivo in vitro con el objetivo de evaluar el uso potencial de la MAH desnuda y comparar la población de células epiteliales de la MAH, con base en sus características morfológicas, propiedades de adhesión y expresión de algunos marcadores característicos, cuando son cultivadas sobre el estroma avascular de la MAH como biosustrato tridimensional, bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación. Las células epiteliales cultivadas sobre el estroma de la MAH en fresco y vitrificada mostraron buena adhesión y crecimiento, además expresaron marcadores típicos del fenotipo epitelial, tales como Pan-citoqueratina y E-cadherina. Estas características nos permiten validar su uso como biosustrato tridimensional para los cultivos celulares.

**Palabras clave:** membrana amniótica humana, criopreservación, vitrificación, biosustrato, células madre epiteliales.

### Human Amniotic Membrane like Three-dimensional Biosubstrate

### ABSTRACT

The human amniotic membrane (HAM) is formed by an epithelial layer of cuboidal cells, a thick basement membrane, and an avascular stroma. It is suggested that the extracellular matrix of HAM and its components are an excellent candidate for use as a native substrate in tissue engineering. In this context and based on the research projects related to tissue bioengineering that have been developed in the laboratory, an in vitro culture system was designed to evaluate the potential use of denuded MAH and compare the population of MAH epithelial cells, based on their morphological characteristics, adhesion properties and expression of some characteristic markers, when they are cultured on the avascular stroma of the HMA as a three-dimensional biosubstrate, under the influence of different cryopreservation conditions. Epithelial cells cultured on the stroma of fresh and vitrified HMA showed good adhesion and growth and also expressed typical markers of the epithelial phenotype, such as Pan-cytokeratin and E-cadherin. These characteristics allow us to validate its use as a three-dimensional biosubstrate for cell cultures.

**Keywords:** human amniotic membrane, cryopreservation, vitrification, biosubstrate, amniotic epithelial stem cells.

## INTRODUCCIÓN

La membrana amniótica humana (MAH) es la capa más interna de la placenta y consiste en una delgada, traslúcida, elástica y semipermeable membrana fetal, que se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico (Niknejad *y col.*, 2008). En los últimos años ha adquirido una gran importancia debido a la capacidad que tiene para reducir la inflamación, mejorar la cicatrización de heridas, y además a que funciona como un sustrato para la proliferación y diferenciación celular, ya que se ha demostrado que la matriz extracelular de la MAH produce una amplia variedad de factores de crecimiento que la hacen ideal para ser utilizado como sustrato nativo en la ingeniería de tejidos (Elkhajji *y col.*, 2022).

La membrana amniótica puede ser utilizada con su estructura íntegra, ya sea con el epitelio amniótico (MA intacta) o sin este (MA desnuda) (Niknejad *y col.*, 2008). Se ha aplicado como sustrato para la proliferación de condrocitos humanos (Díaz –Prado *y col.*, 2011) y para el cultivo de melanocitos (Redondo *y col.*, 2011), logrando ya su aplicación clínica en pacientes. También se está usando como sustrato para promover la expansión de queratinocitos en la reconstrucción de la estructura dérmica (Huang *y col.*, 2012). La MAH es una nueva fuente de obtención de células madre epiteliales y mesenquimales. Estas células madre pueden diferenciarse en queratinocitos, por lo cual se plantea su utilidad para la regeneración de la piel y su futuro potencial clínico (Lan *y col.*, 2020).

En este trabajo nos planteamos aislar células epiteliales de la membrana amniótica humana y cultivarlas sobre el estroma de la MAH desnuda con el objetivo de evaluar su uso potencial como biosustrato tridimensional que permita la adhesión y expresión de algunos marcadores característicos de las células epiteliales, así como también la proliferación celular bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las membranas amnióticas son obtenidas de placentas humanas entre 38-40 semanas de gestación, provenientes de partos por cesáreas, de madres gestantes, a las cuales se les realiza todos los ensayos serológicos de HIV-1/2, Antígeno de superficie de la Hepatitis B, Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C (HCV) y Sífilis (VDRL). Las placentas son suministradas por la Clínica Cristóbal Rojas a través del Dr. González Terán y del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Caracas (HUC), bajo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Bioética del HUC y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Las placentas se transportaron en envases plásticos estériles al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE, a 4 °C. En una campana de flujo laminar de seguridad biológica se separa manualmente la membrana amniótica del corion de la placenta y seguidamente se lava con Solución Buffer de Fosfato libre de calcio y magnesio (PBS), el cual contiene una mezcla de Antibióticos-Antimicótico (Penicilina, Estreptomycina, Gentamicina y Anfotericina B) al 2%. Posteriormente, se extiende sobre gasas estériles para eliminar los restos de sangre y se corta hasta obtener secciones pequeñas.

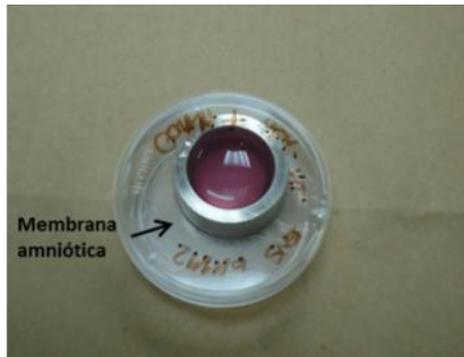
Las secciones de tejido obtenidas son incubadas sin agitación con una mezcla de la enzima Dispasa II 1.2 U/mL en base de medio F12 a 4°C durante 18 horas para posteriormente llevar a cabo la denudación de la membrana amniótica. Seguidamente, los trozos de tejido se transfieren a una placa de Petri estéril, donde son extendidos, cortados y con la ayuda de un rastrillo se obtienen las células epiteliales, las cuales son resuspendidas en PBS y se centrifugan en frío a 2446,66 g por 10 minutos. Posteriormente, las células se siembran con medio Eagle Modificado por Dulbecco-F12 en proporción 3:1 suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB), 1% de Aminoácidos no esenciales, 1% de Antibióticos -Antimicótico, 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), 2mM de L-Glutamina y 1mM de Piruvato de Sodio, en placas de cultivo las cuales están cubiertas previamente con una película de Gelatina al 1%.

**Criopreservación del estroma de la membrana amniótica.** Para la preservación de la membrana amniótica con glicerol se realizó la metodología propuesta por Irfan *y col.*, (2010), con algunas modificaciones. Las secciones de tejido fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en medio de congelación a 4°C, en una proporción 1:1 de DMEM: Glicerol y guardadas en el congelador a -70°C.

Para la vitrificación de la membrana amniótica se realizó la metodología propuesta por Moon *y col.* (2008), con algunas modificaciones. Las secciones de tejido fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en una solución de equilibrio, 20% Etilenglicol en PBS con 20% SFB, por 10 minutos. Posteriormente, se descartó el exceso y se incubó en Solución de vitrificación a 4°C, que contenía 40% Etilenglicol, 18% Linfoprep, 0.3M Sacarosa y 20% SFB, y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -180°C.

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

**Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica.** La población homogénea de células epiteliales con morfología poligonal obtenidas del cultivo primario y de los diferentes subcultivos, son utilizadas para la siembra sobre el estroma de la membrana amniótica siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: luego de realizar el conteo de las células viables se sembraron en placas de 35 mm que contienen un anillo de acero inoxidable que sostiene y delimita el área del biosustrato tridimensional para cada una de las condiciones a ensayar (Figura 1), a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/placa. Posteriormente, se incubó a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> con cambios periódicos de medio. Transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se fijaron con formalina al 10% y finalmente se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes. Como control negativo se utilizó al mismo tiempo muestras de membranas amnióticas frescas recién denucladas y fijadas en formalina al 10%, que posteriormente son procesadas para su evaluación histológica.



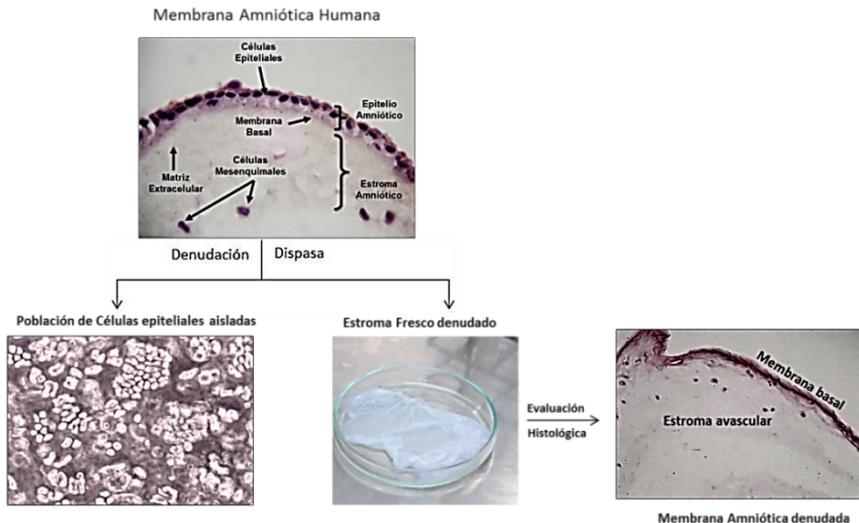
**Figura 1.** Sistema empleado para el cultivo de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la MAH.

Con el fin de evaluar los cambios morfológicos que ocurrieron durante el cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica, se llevan a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases, tomándose registros fotográficos digitales. Además, se realiza la caracterización histológica e inmunohistoquímica en contra de los anticuerpos Pan-CK (anticuerpo monoclonal que reconoce a la CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18 aislado de la A-432 carcinoma epidérmico, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology) el cual es una proteína de filamentos intermedios expresado en el citoesqueleto de las células de origen epitelial y como marcador de la morfogénesis epitelial temprana un anticuerpo contra E-cadherina (anticuerpo que reconoce los aminoácidos 600 – 707 del dominio extracelular E-cadherinas, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology).

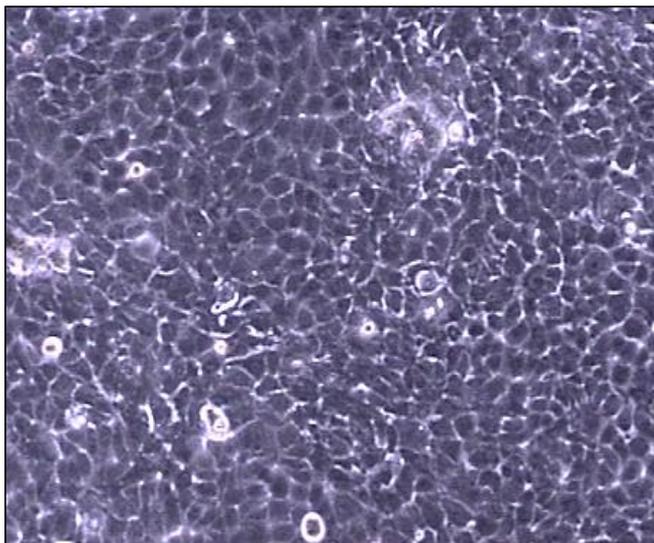
## RESULTADOS

En este trabajo se ensayó el cultivo de células epiteliales amnióticas sobre el estroma amniótico avascular fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado usando como estrategia de cultivo, el cultivo tridimensional. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo ha brindado la posibilidad de simular un microambiente y un soporte estructural similar al que se encuentra en condiciones *in vivo* permitiendo examinar las características morfológicas, la proliferación e interacción intercelular de las células epiteliales amnióticas sobre el biosustrato.

Para usar el estroma de la MAH como andamio, se debe remover el epitelio de la membrana amniótica humana para esto se usó la Dispasa II, la evaluación histológica nos reveló una membrana amniótica denudada completamente libre de células epiteliales. Además, se pudo notar la presencia de una membrana basal intacta por debajo de la cual se distinguen claramente las células mesenquimales incluidas en la matriz extracelular (Figura 2). Por otra parte, la población de células epiteliales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana se sembró y se mantuvieron *in vitro* con la morfología poligonal y uniones intercelulares equivalentes al tejido nativo (Figura 3).



**Figura 2.** Denudación de la MAH con Dispasa donde se obtiene la población de células epiteliales y el estroma denudado. Evaluación histológica donde se puede apreciar el estroma avascular libre de células epiteliales y la membrana basal.



**Figura 3.** Monocapa de células epiteliales de la membrana amniótica con morfología poligonal. 8 días de cultivo. Contraste de fases 200X.

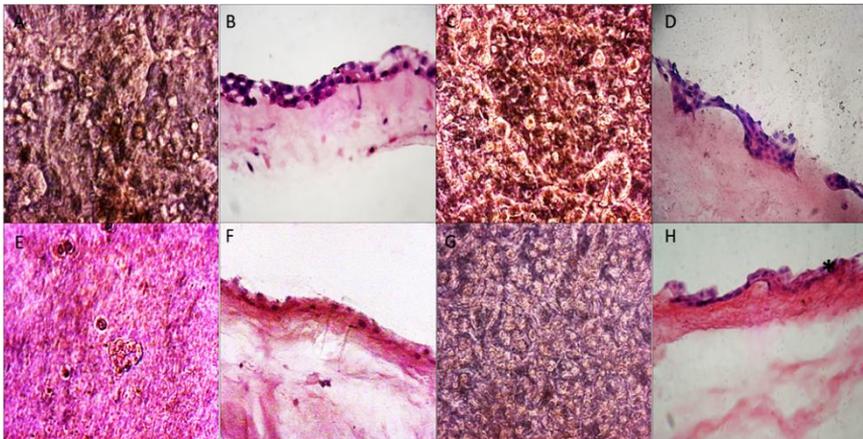
Los resultados de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas sobre el estroma de la membrana amniótica humana variaron dependiendo de si el estroma era fresco, criopreservado con glicerol o vitrificado. En este sentido, los resultados evidenciaron que las células epiteliales amnióticas humanas, presentaron diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión y proliferación característica de las células cuando éstas son cultivadas sobre el estroma amniótico fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado. Con respecto a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco (sin criopreservación), se observa una buena adhesión de las células epiteliales sobre dicha capa estromal. A medida que transcurrieron los días, se formó una monocapa (Figura 4A), al realizar los estudios histológicos se pudo apreciar una excelente integración con el tejido, manteniendo la morfología y estructura típica de células epiteliales e incluso mostraron una estrecha unión intercelular, semejante a un epitelio simple cúbico (Figura 4B)

En cuanto a los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada, se pudo distinguir un comportamiento similar a lo observado en los cultivos sobre la membrana amniótica en fresco; es decir, un gran número de células epiteliales adheridas al biosustrato tridimensional vitrificado, las cuales proliferaron rápidamente a medida que transcurrieron los días de cultivo hasta formar una monocapa (Figura 4C). Sin embargo, al observar las

características de estas células epiteliales sobre el estroma vitrificado se pudo evidenciar un tapizado simple de células donde hubo una buena adhesión, pero discontinuo en algunas zonas (Figura 4D).

En contraste a lo observado anteriormente, las células epiteliales amnióticas mostraron una baja adhesión y proliferación de las células epiteliales al sustrato criopreservado cuando fueron cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservada con glicerol, (Figura 4E). Luego de 17 días de cultivo, en las evaluaciones histológicas correspondientes se pudo observar poca interacción entre las células epiteliales y el tejido criopreservado (Figura 4F).

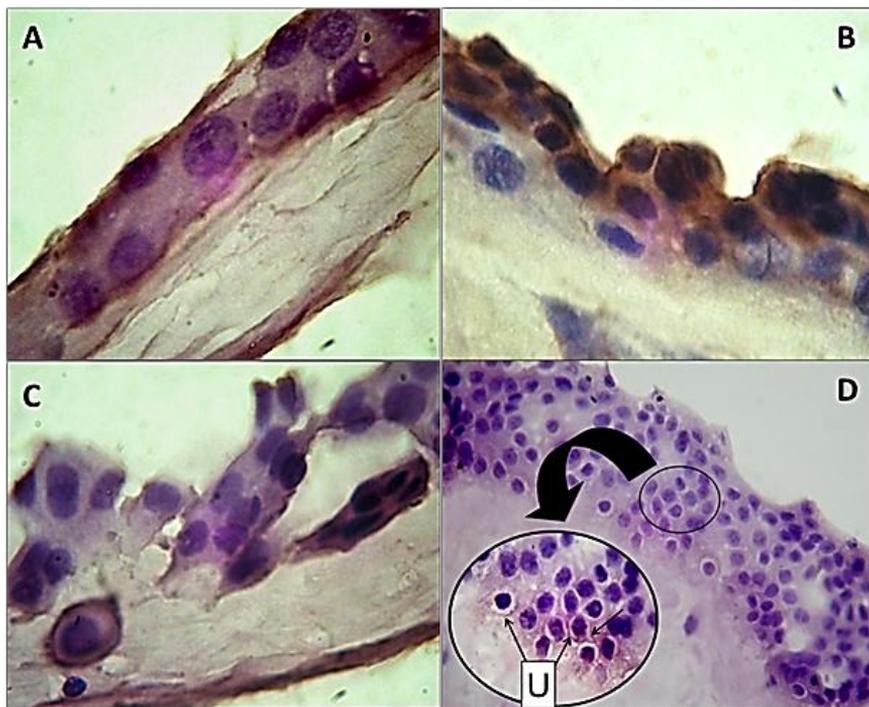
Con base en los resultados anteriores, donde las células del cultivo primario cultivadas sobre la membrana amniótica vitrificada tienen una buena adhesión y proliferación, se decidió evaluar el comportamiento de las células epiteliales que han sido subcultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada. En este sentido, se pudo observar al microscopio de contraste de fases un gran número de células epiteliales amnióticas adheridas al sustrato vitrificado, las cuales proliferaron rápidamente formando una monocapa (Figura 4G). Esto fue corroborado a nivel histológico donde se visualiza la formación de una capa continua y simple de células epiteliales con morfología cuboidal, adheridas al estroma de la membrana amniótica vitrificado, indicando una buena integración de estas células con el tejido vitrificado (Figura 4H).



**Figura 4.** Evaluación morfológica de las CEMAH cultivadas sobre EMAH A-F.- Cultivo primario. A y B.- EMAH fresco. (A) 10 días de cultivo. Contraste de fases 200X. (B) Sección histológica, 17 días de cultivo. Coloración Hematoxilina-Eosina (H/E) 250X. C y D.- EMAH vitrificado. (C) 10 días de cultivo. Contraste de fases 200X. (D) Sección histológica, 14 días de cultivo. Coloración H/E 250X. E y F. EMAH criopreservado. (E) 11 días de cultivo. CF 200X. (F) Sección histológica, 17 días de cultivo. Coloración H/E 200X. G-H. 1er Subcultivo de CEMAH sobre EMAH vitrificado. (G) 5 días de cultivo. CF 100X. (H) Capa simple de células epiteliales(\*) 7 días de cultivo. Coloración H/E 250X.

Por otro lado, también se caracterizó inmunohistoquímicamente las células epiteliales en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sembradas sobre el estroma de la membrana como biosustrato tridimensional, determinando así la presencia de Pan-CK y E-cadherina (Figura 5) marcadores característicos del fenotipo epitelial.

Se pudo observar una expresión positiva moderadamente intensa para Pan-CK de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma amniótico fresco (Figura 5A) y vitrificado (Figura 5B). En cuanto a la expresión de E-cadherina, se aprecia claramente en algunas regiones la expresión de esta proteína en las uniones que se observan entre célula – célula de las células epiteliales amnióticas cultivadas tanto en la membrana amniótica fresca (Figura 5C) como en la vitrificada (Figura 5D).



**Figura 5.** Secciones histológicas de los cultivos de las CEMAH sobre el EMAH. Determinación inmunohistoquímica. A y B.- Pan-CK. (A) EMAH fresca. 10 días de cultivo 1000X. (B) EMAH vitrificado. 10 días de cultivo 1000X. C y D. E-cadherina. (C) EMAH fresca. 10 días de cultivo 1000X. (D) EMAH vitrificado. Células que expresan E-cadherina en las uniones intercelulares (U) se puede ver claramente en la demarcada en el círculo.10 días de cultivo 1000X.

## DISCUSIÓN

Actualmente, las células presentes en la membrana amniótica humana son de gran interés ya que se consideran una fuente alternativa de células madre con propiedades de autorenovación y diferenciación para ser empleadas en la Medicina Regenerativa. (Hu *y col.*, 2023). Además, el estroma de la MAH por sus características biológicas puede ser un elemento clave en la bioingeniería de tejidos, un andamio biocompatible natural donde las células puedan adherirse, promoviendo así la migración, la proliferación y diferenciación celular que van a permitir la formación de un nuevo tejido *in vitro*. (Fenelon *y col.*, 2021).

En este trabajo primero se aislaron y establecieron los cultivos de células epiteliales de la membrana amniótica humana y posteriormente se determinó el potencial que posee el estroma avascular de la membrana amniótica para ser usado como biosustrato tridimensional en los cultivos de las células epiteliales amnióticas.

Para usar el estroma de la MAH como andamio, se debe remover el epitelio de la membrana amniótica para esto se usó la Dispasa II, a nivel histológico se pudo evidenciar una remoción completa de las células epiteliales de la membrana amniótica demostrando que la denudación con esta enzima es eficaz ya que rompe las uniones proteicas que existen entre las células epiteliales lo que concuerda con lo reportado por Koizumi *y col.* (2000), ésto sin alterar la membrana basal y el estroma avascular como se ha señalado en estudios similares realizados por varios autores (Ti *y col.*, 2002; Yam *y col.*, 2002; Ohno-Matsui *y col.*, 2005). De la misma forma, en trabajos realizados con otros tipos de tejidos se ha encontrado que tras el tratamiento con Dispasa II se obtienen excelentes resultados en la separación de la epidermis de la dermis (Bello *y col.*, 1998, Merentes, 2016), así como en la remoción de la mucosa nasal (Rodríguez *y col.*, 2001), de la córnea y el limbo (Gipson y Grill, 1982; Geggel y Gipson, 1989; Espana *y col.*, 2003).

A diferencia del EDTA, la Dispasa actúa enzimáticamente a nivel de las uniones tipo hemidesmosomas que se encuentran en la membrana basal por acción proteolítica. Se ha demostrado que esta proteasa neutral obtenida del *Bacillus polymyxa*, tiene una alta especificidad para la fibronectina y el colágeno IV, lo que la hace particularmente adecuada para separar fácilmente el epitelio del tejido conectivo circundante, además permite mantener viables las células epiteliales disgregadas debido a la baja toxicidad de la Dispasa como se ha demostrado en trabajos realizados por Romero *y col.* (1995) y Merentes (2016).

Con el fin de evaluar el efecto de la criopreservación se comparó la acción del glicerol y la vitrificación sobre la membrana amniótica humana completa y denudada con Dispasa. En los resultados se pudo evidenciar

pequeñas diferencias en cuanto a la morfología de las células que componen la capa epitelial y el estroma avascular de la membrana amniótica humana para ambos métodos de criopreservación al comparar estas con las células que conforman la membrana amniótica humana fresca.

Al observar los resultados obtenidos tras el tratamiento de la membrana amniótica humana completa con el glicerol, se puede apreciar que luego de 10 días de haber sido almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  ocurre una pérdida de volumen en los núcleos de las células epiteliales las cuales se evidenciaron picnóticas como ha sido reportada en estudios realizados por Heng (2009) con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea las cuales fueron criopreservadas con glicerol. Se ha encontrado que luego de la criopreservación con glicerol las células epiteliales amnióticas y las células mesenquimales estromales presentan síntomas de daño y no son capaces de mostrar signos de viabilidad, ya sea con algún colorante o en cultivos *in vitro* (Kruse *y col.*, 2000), posiblemente este fenómeno de reducción en el tamaño de los núcleos que se observa en las células epiteliales se deba a este proceso de pérdida de la viabilidad que se ha reportado en trabajos previos. Por su parte, al observar los resultados obtenidos para la criopreservación del estroma de la membrana amniótica humana con glicerol se pudo observar una ausencia total de las células mesenquimales del estroma y alteraciones en la composición de la matriz extracelular que se evidencia por una leve basofilia del estroma avascular en comparación con el estroma de la membrana amniótica vitrificada, lo que no se corresponde con estudios realizados por varios autores (Irfan *y col.*, 2010, Wagner *y col.*, 2018).

Se ha señalado que la membrana amniótica humana acelular puede representar una alternativa más apropiada y biocompatible para su aplicación en la medicina regenerativa más que la membrana intacta, ya que la descelularización estimula la adhesión y proliferación (Hu *y col.*, 2023). Además, previene una respuesta inmunogénica después del trasplante (Leal Marín *y col.*, 2020).

Diferentes investigadores han realizado una serie de determinaciones inmunocitoquímicas con el fin de evaluar la presencia de colágeno (tipo I, III, IV y V) y fibronectina en la membrana amniótica humana luego de ser criopreservada con glicerol, encontrando que si hay expresión positiva hacia los colágenos y la fibronectina en la membrana amniótica criopreservada indicando que este método permite mantener la matriz extracelular luego de la criopreservación (Malak *y col.*, 1999; Fukuda *y col.*, 1999). Debido a las diferencias observadas en la composición del estroma de la membrana amniótica, luego de la criopreservación sería necesario realizar otro tipo de estudios para determinar si bajo nuestras condiciones es posible mantener cada uno de los componentes que conforman la matriz extracelular.

Con respecto a los resultados obtenidos para el método de criopreservación por vitrificación, tanto de la membrana amniótica completa como del estroma de la membrana amniótica humana, se pudo evidenciar que luego de 10 días de almacenamiento a  $-120^{\circ}\text{C}$  es posible conservar la membrana amniótica y el estroma sin presentar alguna alteración en las características morfológicas típicas de la membrana basal y el estroma avascular de la membrana, demostrando que la vitrificación es un método eficaz que permite preservar la membrana amniótica humana y el estroma amniótico como en el tejido fresco, sin alterar la integridad del tejido como se ha demostrado en los estudios realizados con células mesenquimales derivadas de la membrana amniótica humana (Moon *y col.*, 2008), de la médula ósea (Bahadori *y col.*, 2009), en ovocitos y embriones humanos (Cho *y col.*, 2001; Kalliopi *y col.*, 2008, Dey, 2016). Al observar los resultados obtenidos para la vitrificación de la membrana amniótica completa se apreció una leve reducción en el tamaño de los núcleos que conforman las células de la capa epitelial, sin embargo está pérdida de volumen ocurre en menor proporción en comparación con las células epiteliales amnióticas que se encuentran en la membrana amniótica criopreservada con glicerol donde es mucho más evidente y en donde además la coloración es intensamente basófila, lo que concuerda con estudios realizados por Bahadori *y col.* (2009), quienes demostraron que por el método de vitrificación es posible obtener una mayor viabilidad celular en comparación con los métodos tradicionales de congelamiento lento, similar a lo obtenido por Kalliopi *y col.* (2008) tras comparar la criopreservación de embriones por glicerol y vitrificación.

En nuestro laboratorio utilizando células madre mesenquimales provenientes del cordón umbilical humano (CMCUH) criopreservadas por vitrificación y descongeladas por un período de 4- 16 semanas, se pudo evidenciar que las células mantuvieron sus características morfológicas, capacidad de adherencia y proliferación, así como también su potencialidad de diferenciación neurogénica. Con base en estos resultados se pudo plantear que la criopreservación por vitrificación es un método eficaz ya que permite que las CMCUH conserven su identidad morfológica y su potencialidad de diferenciación neurogénica después de la congelación (Sánchez, 2018).

En este estudio, se estableció un protocolo de vitrificación donde se empleó el etilenglicol como crioprotector, el cual es muy utilizado para la vitrificación de embriones de ratones (Kasai *y col.*, 2004), blastocistos humanos (Cho *y col.*, 2001) y de células madre embrionarias (Nie *y col.*, 2009) concordando nuestros resultados con los obtenidos por Gajada *y col.* (2007), encontrando que el etilenglicol es mucho menos tóxico para la vitrificación en comparación con otros crioprotectores. Además del etilenglicol, la solución de vitrificación también emplea aditivos con altos pesos moleculares, tales como la sacarosa, los cuales pueden reducir significativamente la toxicidad por disminución de la concentración de agentes permeables necesarios para la solución de vitrificación, y agentes

como el Ficoll o en nuestro caso el Linfoprep, el cual es una macromolécula que promueve la penetración del crioprotector, y que se ha demostrado tiene varias ventajas en cuanto a toxicidad, mayor solubilidad y menor viscosidad (Kasai *y col.*, 2004). Al igual que el etilenglicol se ha encontrado que el glicerol tiene baja toxicidad para la mayoría de las células, sin embargo, el principal inconveniente con este crioprotector es que penetra lentamente en las células a diferencia del etilenglicol (Gil-Loyzaga, 2011).

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

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

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

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

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

Por su parte, en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada se observaron células epiteliales adheridas sobre el biosustrato vitrificado y una alta proliferación de las células que fue corroborado por la evaluación

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

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

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

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

El hecho de que las células epiteliales cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco y vitrificada tenga una buena adhesión, crecimiento, además del mantenimiento de la morfología epitelial expresando los marcadores Pan-CK y E-cadherina nos permite validar su uso como biosustrato tridimensional para los cultivos celulares.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) No. 2012000813, y el Proyecto de Grupo CDCH PG-03-8310/2011/1.

## **LITERATURA CITADA**

- Bahadori, M., B. Soltani, E. Mirzajani, P. Babaei, M. Masou, M. Jalali. 2009. Cryopreservations of rat bone marrow derive mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. *Yakhteh Medical Journal*. 11(3): 317 – 326.
- Baharvand, H., M. Heidari, M. Ebrahimi, T. Valadbeigi y G. Salekdeh. 2007. Proteomic analysis of epithelium-denuded human amniotic membrane as a limbal stem cell niche. *Mol. Vis.* 13: 1711 – 1721.
- Bello, G., E. Merentes y F. Arvelo. 1998. Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*, *Gaceta Médica* 106 (4): 491- 495.
- Cho, H., W. Son, S. Yoon, S. Lee, J. Lim. 2001. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.* 17: 2419 – 2422.
- Dey A. 2016. Cryopreservation. *RRJVS* 2:2429.

- Díaz-Prado, S., M. Rendal, E. Muiños, T. Hermida y M. Rodríguez. 2010. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank*. 11(2): 183 – 195.
- Díaz-Prado, S., E. Muiños, T. Hermida-Gómez, C. Cicione, M. Rendal, I. Fuentes, F. De Toro y F.J. Blanco. 2011. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*. 1: 162 – 171.
- Dobrevá, M., P. Pereira, J. Deprest y A. Zwijsen. 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int. J. Dev. Biol*. 54: 761 – 777.
- Elkhenany, H., A. El-Derby, M. Abd Elkodous y col. 2022. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. *Stem Cell Res Ther* 13, 8 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02684-0>.
- Espana, E., A. Romano, T. Kawakita, M. Di Pascuale, R. Smiddy y N. Tseng. 2003. Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44: 4275 – 4281.
- Fênelon, M., S. Catros, C. Meyer, J.C. Fricain, L. Obert, F. Auber, A. Louvrier y F. Gindraux. 2021. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes* (Basel). May 25;11(6):387. doi: 10.3390/membranes11060387. PMID: 34070582; PMCID: PMC8227127.
- Fukuda, K., T. Chikama, M. Nakamura, T. Nishida. 1999. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea*. 18 (1): 73 – 79.
- Gajada, B., L. Katska-Ksiazkiewicz, B. Rynska, M. Bochenek, Z. Smorag. 2007. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *Cryo. Letters*. 23(2): 271 – 279.
- Geggel, H., I. Gipson. 1985. Removal of viable sheets of conjunctival epithelium with dispase II. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*. 26: 15 – 22.
- Gil-Loyzaga, P. 2011. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Editorial Visión Libros. Primera Edición. Madrid, España.
- Gibson, I., S. Grill. 1982. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 23: 269 – 273.
- Heng, B. 2009. Effector rho-associated kinase (rock) inhibitor y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 41(5): 376 – 380.
- Hu, Z., Y. Luo, R. Ni, Y. Hu, F. Yang, T. Du y Y. Zhu. 2023. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. *Mater Today Bio*. 1;22:100790. doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100790. PMID: 37711653; PMCID: PMC10498009.
- Huang, G., S. Ji, P. Luo, H. Liu, S. Zhu, G. Wang, P. Zhou, S. Xiao y Z. Xia. 2012. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane. *Cell Transplant*. 22: 1831-1844.
- Ilancheran, S., Y. Moodley y U. Manuelpillai. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*. 30: 2 – 10.
- Irfan, Z., A. Fareeha y A. Wajid. 2010. Technique for processing and preservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *World Acad Sci. Engineering and Technology*. 69: 763 – 766.
- Ishino, Y., Y. Sano, T. Nakamura, C. Connon, H. Rigby, N. Fullwood, S. Kinoshita. 2004. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 45(3): 800 – 806.

- Jin, C., S. Park, B. Choi, K. Lee, C. Kang, B. Min. 2007. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.* 13: 693 – 702.
- Kalliopi, L., E. Kolibianakis, C. Venetis. 2008. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 90: 186 – 193.
- Kasai, M., T. Mukaida. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed.* 9:164 – 170.
- Koizumi, N., T. Inatomi, A. Quantock, N. Fullwood, A. Dota, S. Kinoshira. 2000. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea.* 19: 65 – 71.
- Kruse, F., A. Jousen, K. Rohrschneider. 2000. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Arch. Cli. Exp. Ophthalmol.* 238: 68 – 75.
- Lan D., P. Binh, N. Giang y col. 2020. Isolation and Differentiation of Amniotic Membrane Stem Cells Into Keratinocytes. *Cell Transplantation.* 2020;29. doi:10.1177/0963689720964381.
- Leal-Marin, S., T. Kern, N. Hofmann, O. Pogozhykh, C. Framme, M. Börgel, C. Figueiredo, B. Glasmacher y O. Gryshkov. 2021. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 109(8):1198-1215. doi: 10.1002/jbm.b.34782. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33319484.
- Malak, T., C. Ockleford, S. Bell, R. Dalgleish, N. Bright y J. Macvicar. 1999. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14:385-406.
- Manuelpillai, U., Y. Moodley, C. Borlongan y O. Parolini. 2011. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis. *Placenta* 32: s320 – s325.
- Meller, D., R. Pires, R. Mack, F. Figueiredo, A. Heiligenhaus, W. Park, P. Prabhasawat y col. 2000. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology.* 107: 980 - 989.
- Merentes, E. 2016. Manual de técnicas básicas del cultivo celular. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Miki, T., T. Lehmann, H. Cai, D. Stolz y S. Strom. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 23: 1549 – 1559.
- Moon, J., J. Lee, B. Jee, Ch. Suh, S. Kim, H. Lim y H. Kim. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.* 23(8): 1760 –1770.
- Muñoz, 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 De Coruña, España.
- Nie, Y., V. Bergendahi, D. Hei, J. Jones, S. Palecek. 2009. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol. Prog.* 25(1): 20 – 31.
- Niknejad, H., H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi y A. Seifalian. 2008. Properties of amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* 15: 88 – 99.
- Niknejad, H., H. Peirovi, A. Ahmadiani, J. Ghanavi y M. Jorjani. 2010. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur. Cells Mater.* 19: 22 – 29.

- Ohno-Matsui, K., K. Mori, A. Ichinose, T. Sato, J. Wang, N. Shimada, A. Kojima y col. 2006. In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol. Vis.* 12: 1022 – 1032.
- Redondo, P., A. Giménez, L. Marques, M. García-Guzmán, E. Andreu y F. Prosper. 2011. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatology Res. Practice*. Article ID 532139, DOI: 10.1155/2011/532139.
- Regauer, S., W. Franke, I. Virtanen. 1985. Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J. Cell Biol.* 100: 997 – 1009.
- Rendal, M., A. San Luis, M. Pimentel, I. López, N. Domenech, C. Andión y F. Blanco. 2012. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 13: 513-9.
- Rodríguez, J., L. Romero, E. Merentes, F. Arvelo, J. Hernández, C. Hernández. 2001. Efecto citotóxico de la cocaína en cultivo primario de células del epitelio nasal respiratorio. *Rev. Toxicol.* 18(3): 150 – 151.
- Romero, L., E. Merentes, G. Quijada, F. Arvelo. 1995. Utilización de la lectina griffonia simplicifolia (gsII) como marcador de diferenciación *in vitro* de la mucosa gástrica de ratones. *Acta Científica Venezolana.* 46(1): 27.
- Rota, A., Ch. Milani, G. Cabianca, M. Martini. 2005. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology.* 65: 1848 – 1858.
- Sánchez, A. 2018. Caracterización y potencialidad de diferenciación neurogénica de células madre del cordón umbilical humano criopreservadas por vitrificación. Trabajo especial de grado de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Ti, S., D. Anderson, A. Touhami, C. Kim, S. Tseng. 2002. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2584 – 2592.
- Wagner, M., P. Walter, S. Salla, S. Johnen, N. Plange, S. Rütten, T.W. Goecke y M. Fuest. 2018. Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 256(6):1117-1126. doi: 10.1007/s00417-018-3973-1. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29623460.
- Yang, L., Y. Shirakata, M. Shudou, X. Dai, S. Tokumaru, S. Hirakawa, K. Sayama y col. 2006. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell. Tissue. Res.* 326: 69 - 77.
- Yam, H., C. Pang, D. Fan, B. Fan, E. Yu, D. Lam. 2002. Growth factor changes in *ex vivo* expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea.* 21: 101 – 105.