

Las células del epitelio amniótico humano (CEAh) como posible fuente de células troncales (CT)

Guadalupe García-López¹, Irma Lydia García-Castro¹, Daniela Avila-González¹, Anayansi Molina-Hernández¹, Héctor Flores-Herrera², Horacio Merchant-Larios³ y Fabián Díaz-Martínez^{1*}

¹Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinosa de los Reyes», México, D.F.; ²Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinosa de los Reyes», México, D.F.; ³Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Resumen

Gracias a la investigación con CT se han realizado avances significativos en el campo de la biología del desarrollo. Las CT se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y diferenciación a distintos tipos celulares. Se han descrito dos tipos de CT de acuerdo con el momento de su obtención: células troncales embrionarias (CTE) y adultas (CTA), las cuales tienen características propias. Sin embargo, se han reportado diversos problemas con ambos tipos celulares que tienen que ser resueltos antes de su posible aplicación en la clínica, motivo por el cual se ha sugerido que las membranas fetales podrían ser una fuente alternativa para obtener CT. En las CEAh se ha encontrado la presencia de marcadores característicos de CT pluripotentes y se ha documentado su capacidad como capa alimentadora para la expansión de diferentes tipos de CT. Además, al ser un producto de desecho después del parto, su obtención no conlleva problemas éticos, motivo por el cual este tipo de células se han convertido en una promesa para su posible uso en medicina regenerativa.

PALABRAS CLAVE: Células troncales. Membranas fetales humanas. Células del epitelio amniótico humano.

Abstract

There have been major recent advances in the field of developmental biology due to the investigation on stem cells (SC). Stem cells are characterized by their capacity of auto-renewal and differentiation to different cellular phenotypes. Based on the developmental stage, they can be classified into two different types: embryonic SCs and adult SCs. It has been widely reported that several problems need to be resolved before their possible clinical applications. As a result, fetal membranes have been suggested as an alternative source of SCs. In the human amniotic epithelium, the presence of markers of pluripotent SC's has been reported, and its capacity as a feeder layer for expansion of different SC types. Also, fetal membranes are a discarded product after delivery, and thus there are not any ethical issues related to its use. In conclusion, the human amniotic epithelium can be a strong candidate for regenerative medicine. (Gac Med Mex. 2015;151:66-74)

Corresponding author: Fabián Díaz, nfdiaz00@yahoo.com.mx

KEY WORDS: Stem cell. Human fetal membrane. Human amniotic epithelial cell.

Correspondencia:

*Fabián Díaz-Martínez
Departamento de Biología Celular
Instituto Nacional de Perinatología
Montes Urales, 800
Col. Lomas Virreyes, Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11000, México, D.F.
E-mail: nfdiaz00@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 22-07-2013
Fecha de aceptación: 19-05-2014

Introducción

Gracias a la investigación en el área de las CTE se han realizado grandes avances en los campos de la biología del desarrollo y la biología celular en los últimos años. Asimismo, por su amplio potencial de diferenciación, este tipo de células han aumentado el interés y mantenido la promesa de su posible aplicación en terapias de reemplazo celular. Sin embargo, existen severos problemas que se tienen que resolver antes de poder hacer la traslación de la investigación básica a la clínica con las CTE. Ejemplo de ello es su potencial de formar tumores cuando son trasplantadas en estado indiferenciado¹, así como los problemas éticos que conlleva su derivación². De igual manera, se ha sugerido el uso de las CTA, las cuales pueden ser obtenidas de tejidos provenientes de organismos adultos como la médula ósea, el cerebro, el músculo, etc. Aunque estas células han sido estudiadas, su extracción es difícil y el número obtenido es insuficiente para una posible aplicación en terapias de reemplazo celular. Asimismo, presentan una proliferación y plasticidad limitadas en comparación con las CTE³, motivo por el cual se han buscado fuentes alternativas de CT; de esta forma, se han sugerido las CEAh^{4,5} porque presentan una serie de características únicas⁶. Por ello nos centraremos en ellas como posible fuente de CT y en su posible uso en esta interesante área de investigación.

CT

Las CT se caracterizan por ser células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación y diferenciación a distintos tipos celulares especializados. Se encuentran presentes en diversos tejidos durante el desarrollo embrionario, así como en animales adultos. En primera instancia, se pueden clasificar de acuerdo con su potencial de diferenciación (Tabla 1).

Puede realizarse una clasificación adicional de acuerdo con la etapa del desarrollo en que son aisladas: CTE y CTA.

CTE

En 1981, los grupos de Martin Evans y Gail Martin aislaron por primera vez líneas celulares pluripotentes obtenidas del blastocisto preimplantación de ratón, y las denominaron CTE^{7,8}. La derivación de estas líneas se logró al crecer la masa celular interna del blastocisto

Tabla 1. Clasificación de las CT por su potencial de diferenciación

Clasificación	Potencial de diferenciación
Totipotente	Capacidad para formar todos los linajes del organismo; en mamíferos sólo el cigoto es totipotente
Pluripotente	Capacidad para formar todos los linajes del embrión incluyendo las células germinales; por ejemplo, las CTE
Multipotente	Potencial para formar células restringidas en su origen a una capa embrionaria en particular; por ejemplo, las CT neurales, las cuales se diferenciarán a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos
Unipotente	Células que forman sólo un tipo celular específico; por ejemplo, las CT epiteliales

Modificado de Jaenisch, et al.⁶⁸.

sobre una capa «nodriza» de fibroblastos extraídos de embriones de ratón (*mouse embryonic fibroblast* [MEF]) de 14 días de gestación. Los fibroblastos secretaban factores solubles que permitieron mantener las células de la masa celular interna en estado pluripotente *in vitro*, y con ello se logró la obtención de dichas líneas celulares. Las CTE provenientes de ratón son de las más estudiadas hasta el momento y se caracterizan por presentar un núcleo grande con un citoplasma pequeño, crecer en colonias compactas, tener una alta actividad de la telomerasa (la telomerasa está asociada con la capacidad de proliferación celular, protección y estabilización de los cromosomas)⁹ y mostrar un cariotipo normal (es decir, sólo una pequeña proporción presenta anormalidades cromosómicas). Asimismo, estas células pueden ser mantenidas *in vitro* sin una pérdida aparente de sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. Expresan marcadores moleculares como la fosfatasa alcalina tejido inespecífica (enzima presente también en células de la línea germinal), factores que regulan la transcripción para mantener las células en estado indiferenciado (*octamer binding transcription factor 4* [Oct-4] SRY (*sex determining region Y*)-box 2 [Sox2] y Nanog) y proteínas transmembranales (*stage-specific embryonic antigen* [SSEA-1], *tumor rejection antigen* [TRA-1-60]). De esta forma, mantenidas en condiciones que favorecen su estado pluripotente, estas células no presentan características morfológicas ni moleculares de células diferenciadas.

Con procedimientos similares a los usados para derivar las CTE de ratón, el grupo de Thomson generó CTE de primates no humanos (monos Rhesus)¹⁰ y posteriormente de humanos. En 1998, reportaron el aislamiento y cultivo de cinco líneas de células troncales embrionarias humanas (CTEh), las cuales fueron obtenidas de embriones de menos de una semana provenientes de clínicas de fertilización *in vitro* y donados específicamente para este objetivo por los padres. De esta forma, al cultivarlos *in vitro*, obtuvieron colonias redondeadas, con bordes bien definidos, compactas y planas, con células que presentaban un núcleo prominente y una relación núcleo-citoplasma alta y que mantenían una capacidad de proliferación ilimitada¹¹.

Una vez que se obtiene una línea de CTE, se debe comprobar su naturaleza pluripotente mediante una serie de pruebas en el laboratorio. En el caso de las células provenientes del ratón, ésta puede ser demostrada inyectando las CTE en blastocistos de la misma especie y observando su contribución a todos los tejidos del animal, incluidos los espermatozoides y ovocitos¹². De esta forma, se obtienen organismos quiméricos con una línea germinal funcional¹³. También se ha demostrado la naturaleza pluripotente mediante complementación tetraploide, que consiste en producir blastocistos 4n por fusión celular e introducción de CTE en el blastocisto. Como las células 4n no pueden producir células somáticas, los organismos resultantes están conformados completamente por derivados provenientes de las CTE¹⁴. Finalmente, también se ha probado su capacidad pluripotente al formar células diferenciadas en cultivos *in vitro*, ya sea de manera directa o indirecta. El primer método consiste en retirar las señales que permiten la autorrenovación; con ello las células se diferencian de forma espontánea. En el segundo método se emplean protocolos de diferenciación, exponiendo las células a condiciones de cultivo y factores de crecimiento específicos para inducir las a un linaje en particular¹⁵.

En el caso de las CTEh, por razones éticas no se pueden producir animales quiméricos ni la complementación tetraploide. De esta manera, el estándar más alto es la formación de teratomas (tumores que poseen células de los linajes del ectodermo, el endodermo y el mesodermo) al inyectar las CTEh en ratones inmunodeficientes¹⁶ y la demostración de que las células son capaces de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias *in vitro* de la forma antes descrita. Junto a estas pruebas, el reconocimiento de la identidad de las CTE se ha logrado mediante el uso

de marcadores moleculares (Oct-4, Sox-2, Nanog y fosfatasa alcalina) y antígenos de superficie (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81), que son exclusivos de este tipo de células. Sin embargo, la investigación con CTEh conlleva controversias éticas y políticas, las cuales tienen que resolverse antes de poder llevarlas a la investigación clínica².

Finalmente, cabe mencionar que se han descrito otros tipos de células pluripotentes, como las CT del epiblasto y las células troncales pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cell* [iPSC]). Sin embargo, por razones de espacio no profundizaremos en ellas. Se recomienda al lector revisar las siguientes publicaciones Chenoweth, et al.¹⁷, Stadtfeld, et al.¹⁸, Teoh, et al.¹⁹ y Wu, et al.²⁰.

CTA

Las CT provenientes de tejido adulto se hallan incrustadas entre las células diferenciadas de tejidos y órganos, y su papel principal es mantener y reparar los nichos en donde se encuentran. Los nichos representan un microambiente tisular especializado donde las CT establecen interacciones complejas y recíprocas con las células de soporte y con la matriz extracelular mediante la formación de uniones adherentes mediadas por cadherinas, cateninas, integrinas, selectinas y sus ligandos, moléculas de adhesión, receptores para factores de crecimiento y quimioquinas, etc.²¹. Asimismo, participa en la secreción de diversos factores solubles como mecanismos de interacción celular no mediados por adhesión (Wnt/frizzled, Notch/Delta-Jagged) que contribuyen a la movilidad restringida de la CT y a la adopción de un estado quiescente o la adquisición de un estado activo dentro del nicho^{22,23}.

Normalmente estas células son multipotentes, ya que tienen cierto compromiso para formar células del tejido en donde se encuentran. Este tipo celular se ha identificado en diversos órganos, como el cerebro, la médula ósea, el músculo esquelético, la piel, el intestino, etc. Sin embargo, su número es muy limitado y son difíciles de localizar y aislar; además, su rango de diferenciación está limitado al tipo celular del tejido donde se derivaron, como se ha mencionado anteriormente^{24,25}.

Debido a los inconvenientes mencionados sobre la obtención y utilización tanto de las CTEh como de las CTA, los investigadores han buscado fuentes alternas como los tejidos extraembrionarios humanos.

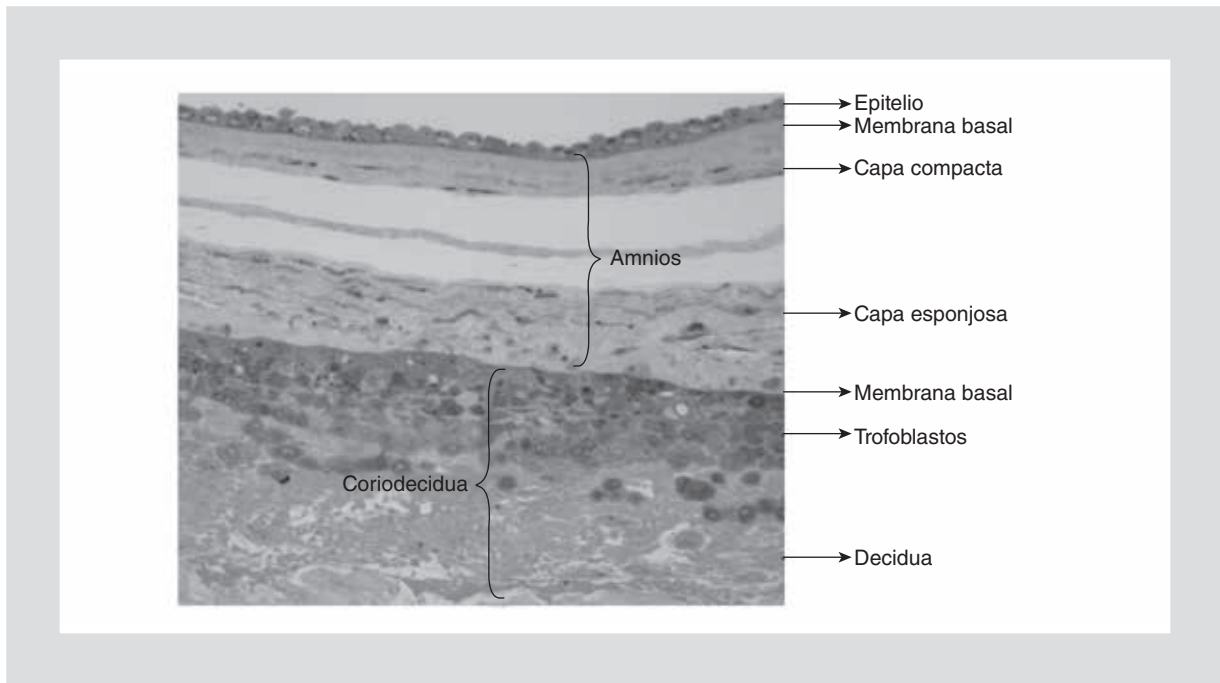


Figura 1. Corte semifiño (1 μm) de la membrana fetal humana de 40 semanas de gestación obtenida mediante cesárea programada, incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. Corte transversal en que se distinguen las dos regiones que la constituyen: amnios y corion (20X). (Modificada de la Tesis de Maestría de Guadalupe García-López, UNAM, 2007).

Tejidos extraembrionarios humanos

Los tejidos extraembrionarios están compuestos por la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales. La placenta a término pesa entre 400 y 600 g²⁶, y tiene una forma discoidal, con un diámetro de 15-20 cm y un grosor de 2-3 cm. Presenta dos caras: una de origen fetal orientada hacia la cavidad amniótica, llamada placa coriónica e integrada por el amnios y el corion, y la placa basal, formada por las deciduas (basal y parietal) de origen materno^{27,28}. Actúa como una interfase entre la madre y el feto, involucrada en el intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho. Además, funciona como un órgano endocrino que produce hormonas y factores de crecimiento que regulan tanto el crecimiento fetal como la fisiología materna²⁹. Por lo que se refiere al cordón umbilical, está compuesto por un tejido conectivo mucoso denominado gelatina de Warthon que se extiende entre el epitelio amniótico y cubre los vasos umbilicales. Su función principal es evitar la compresión, torsión y flexión de dichos vasos, los cuales proveen el flujo sanguíneo bidireccional entre la circulación materna y fetal³⁰. Finalmente, las membranas fetales están constituidas por dos membranas que se encuentran adosadas, la amniótica y la del corion (Fig. 1).

Membranas fetales humanas

La membrana amniótica es una estructura biológica translúcida que no tiene nervios, músculos o vasos linfáticos. El grosor del amnios varía de 0.02 a 0.5 mm y consiste en tres capas histológicas: capa epitelial, membrana basal y tejido mesenquimal avascular. La capa interna, adyacente al líquido amniótico, está constituida por un manto homogéneo de células cuboides firmemente fijadas a la membrana basal, la cual a su vez está unida a una capa acelular compuesta de colágena tipo I, II y V. Por fuera de ésta, se encuentra un recubrimiento de células estromales de tipo fibroblastos y escasos macrófagos, incrustados en una malla de fibras reticulares. Más externamente, se encuentra una capa muy variable en espesor, que es la capa intermedia o esponjosa, rica en elastina, proteoglicanos hidratados (especialmente perlecan), glucoproteínas y fibras de colágeno tipo III, que separan el amnios del corion. Por lo que se refiere al corion, es la zona histológica más gruesa de las membranas fetales y tiene mayor celularidad que el amnios. La porción final del corion se interdigita con la decidua uterina.

En particular, las CEAh tienen microvellosidades en su superficie apical y presentan tanto una función

secretora como de transporte intra y transcelular. Asimismo, se ha descrito un núcleo grande irregular con organelos intracitoplasmáticos y vesículas pinocíticas. Una de las funciones básicas de las CEAh es proporcionar al embrión en desarrollo un ambiente en suspensión, en el cual el embrión pueda crecer libre de la presión de las estructuras que rodean su cuerpo y protegido contra la desecación. Asimismo, se han descrito múltiples funciones metabólicas, tales como el transporte de agua y materiales solubles y la producción de factores con una función biológica específica, incluyendo péptidos vasoactivos, factores de crecimiento y citosinas³¹. Finalmente, y de manera interesante, se ha sugerido la presencia de CT en las CEAh, como se describirá más adelante.

Desarrollo embrionario del epitelio amniótico humano

A diferencia de otras estructuras que conforman la placenta, el amnios se origina alrededor del octavo día después de la fertilización, antes de que se dé la gastrulación. En este periodo el blastocisto se encuentra implantado en el estroma endometrial y la masa celular interna se diferencia en dos capas: una de células cuboides (hipoblasto) y otra de células cilíndricas (epiblasto). A partir del epiblasto se originan las tres capas embrionarias que conforman el embrión, mientras que el hipoblasto dará origen al endodermo extraembrionario³². Dentro del epiblasto aparecerá una pequeña cavidad (cavidad amniótica), cuyas células adyacentes (amnioblastos) formarán el epitelio amniótico. El desarrollo del amnios a partir del epiblasto es muy importante, ya que sugiere que este tejido puede contener una población de CT^{5,33}.

Derivación y mantenimiento de las CEAh *in vitro*

Se han reportado diferentes protocolos en la literatura para la derivación de las CEAh *in vitro*. De manera general, éstas se obtienen a partir de placentas a término de 38-39 semanas de gestación mediante cesárea electiva, bajo consentimiento informado. Es importante destacar que las mujeres no deben presentar trabajo de parto, ruptura prematura de membranas, corioamnioitis o anomalías cromosómicas para la donación del tejido. Los protocolos para el aislamiento de CEAh consisten en separar mecánicamente la membrana amniótica del corion, lavarla con una solución amortiguadora, posteriormente incubarla a 37 °C

con tripsina a diferentes tiempos y distintas concentraciones^{5,34-40} o utilizando dispasa 1.2 U/ml y raspando el tejido para remover las células³⁵. Una vez obtenidas las CEAh, se cultivan a distintas densidades por cm² que van desde 6 x 10⁴ hasta 1 x 10⁵, en medio *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) suplementado y en presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de 10 ng/ml^{37,41,42}. Cabe mencionar que la composición de este medio es muy similar al utilizado en CTE^{43,44}.

Finalmente, se ha reportado la obtención de CEAh en medio libre de xenocontaminantes (libre de derivados animales), pensando en su posible aplicación en la clínica. De esta forma se han empleado reactivos modificados, los cuales incluyen como solución de digestión a Trypzean (no contiene contaminantes animales encontrados tradicionalmente en la tripsina bovina o porcina) y medio EpiLife (medio basal libre de suero)⁴⁵.

Marcadores moleculares y de superficie celular presentes en las CEAh

Las CEAh, al ser teñidas con hematoxilina-eosina en condiciones *in vitro*, presentan una apariencia homogénea^{37,46}. No obstante, se ha descrito que estas células expresan un fenotipo heterogéneo al determinar los marcadores de membrana, con diferentes grados de expresión antigénica, lo que estaría indicando la existencia de subpoblaciones celulares, probablemente de CT conjuntamente con células más diferenciadas. De esta forma, las células expresan una gran variedad de antígenos de superficie (Tabla 2).

De manera interesante, expresan marcadores moleculares asociados con las CTE como Oct-4, Sox-2, Nanog, *reduced expression 1* (Rex-1), *fibroblast growth factor-4* (FGF-4), *cryptic family 1* (CFC-1), *developmental pluripotency-associated protein 3* (DPPA-3), y c-kit^{5,35,37,47}. Estos factores de transcripción desempeñan un papel importante a la hora de mantener el estado pluripotente de las células, a través de redes complejas entre ellos^{48,49}. Asimismo, se ha reportado que las CEAh cultivadas *in vitro* son positivas a la enzima fosfatasa alcalina tejido inespecífica (marcador de CTE)³⁵. Finalmente, se ha demostrado que las CEAh expresan niveles bajos o moderados de los antígenos polimórficos HLA A-B-C (clase Ia), carecen de HLA-DR (clase II)⁴¹ y expresan HLA-G⁵⁰, datos que pueden explicar el bajo poder inmunogénico de la membrana amniótica humana y la falta de rechazo cuando es trasplantada^{51,52}.

Tabla 2. Expresión de antígenos de superficie presentes en las CEAh

Referencia	Antígeno en CEAh
Miki, et al. ³⁷ , Raisanen, et al. ⁶⁹	CCR-4, CD117 (c-kit), CD24, CD324 (E-cadherina), CD338 (ABCG-2), CD49f, CD54 (ICAM-1), CD9, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Ilancheran, et al. ⁵	CD90, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Minas, et al. ⁷⁰	GCTM-2, SSEA-4
Parolini, et al. ⁷¹	CD10, DC105, CD117 (c-kit), CD13, CD140b, CD166 (ALCAM), CD29, CD324 (E-cadherina), CD44, CD49e, CD73, CD90, GTM-2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Banas, et al. ⁷²	c-met, CD24, CD29, CD324 (E-cadherina), CD338 (ABCG-2), CD9, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Stadler, et al. ⁷³	CD54 (ICAM-1)
Bilic, et al. ³⁵	CD166 (ALCAM), CD44, CD49d, CD73, SSEA-3, SSEA-4
Fatimah, et al. ⁷⁴	CD44, CD73, CD9
Murphy, et al. ⁴⁵	CD1b, CD10, CD26, CD29, CD34, CD45, CD46, CD55, CD58, CD29, CD63, CD73, CD77, CD81, CD90, CD91, CD95, CD98, CD104, CD108, CD109, CD142, CD147, CD151, CD164, CD166, CD227, EGFR, fil-R, HLA-ABC, HLA-DQ
Pratama, et al. ⁴¹	E-cadherina, CD49f, CK7, EpCAM, vimentina, CD44, CD105, CD90, CD146, CD29, HLA-ABC, CD40
Maguire, et al. ⁷⁵	SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81

CCR-4: receptor de quimiocina tipo 4; CD: grupo de diferenciación; GCTM-2: marcador tumoral de células germinales; CK7: citoqueratina 7; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HLA: antígeno de leucocitos humano.

Adicionalmente, las CEAh, al ser cultivadas *in vitro*, expresan marcadores específicos de cada una de las tres capas embrionarias. Por lo que respecta al ectodermo, se ha localizado nestina, proteína asociada a microtúbulos (MAP-2), proteína de neurofilamentos intermedios, proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y enolasa específica de neuronas³⁷. Los marcadores del endodermo son: proteína 4 de unión a *globin transcription factor* (GATA) (GATA-4), factor nuclear de hepatocitos 3 β (HNF-3 β), α -fetoproteína y transportador de glucosa (GLUT-2). Finalmente, los marcadores del mesodermo son: péptido natriurético atrial, miosina

de cadena pesada y ligera, actina, etc., todos ellos relacionados con el linaje cardiomiocítico³⁷. Estos datos en conjunto sugieren la naturaleza del estado pluripotente de las CEAh, así como su gran heterogeneidad.

Pruebas de pluripotencia en las CEAh

Como se ha mencionado, existe una serie de pruebas de laboratorio para demostrar la naturaleza pluripotente de las CT. En el caso de las CEAh, Tamagawa, et al., en 2004, fueron los primeros en describir sus características pluripotentes, al crear quimeras xenogénicas *in vitro* a partir de células aisladas del amnios humano con células embrionarias de ratón, y demostraron la contribución de las CEAh a la formación de las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo) mediante la formación de cuerpos embrionarios⁵³.

Asimismo, se ha reportado la capacidad de las CEAh para formar colonias clonales (propiedad de las CTE) en cultivos a baja densidad (30-50 células por cm²)^{5,41}. No obstante, y a diferencia de las CTEh, estas células no son capaces de formar teratomas: al ser inoculadas a una densidad de 5 x 10⁵ células en testículos de ratón inmunodeficiente, no se reportó la formación de tumores después de 10 semanas⁵. De manera similar, Miki, et al. inyectaron 1 x 10⁶ CEAh en el hígado y los músculos de las piernas traseras de ratones *severe combined immunodeficiency* (SCID); los animales fueron revisados a los siete meses buscando cualquier evidencia de crecimiento tumoral, pero los autores no reportaron ningún hallazgo³⁷. Estos datos demuestran que la CEAh al ser inyectadas en el ratón inmunodeficiente no son capaces de formar teratomas, propiedad que sería de gran utilidad en la clínica, ya que uno de los grandes problemas en la aplicación de las CTEh es la posible formación de teratomas al ser trasplantadas en estado indiferenciado.

No obstante la pérdida de la formación de teratomas, las CEAh han sido diferenciadas *in vitro* hacia derivados del endodermo, el mesodermo y el ectodermo (Tabla 3). Cabe mencionar que las técnicas utilizadas para la determinación del fenotipo deseado se realizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunocitoquímica.

Las CEAh como capa nodriza de células pluripotentes

Las CEAh, a diferencia de las CTEh, no necesitan un segundo tipo celular como capa nodriza para su

Tabla 3. Diferenciación *in vitro* de CEAh a células especializadas de las tres capas embrionarias

Referencia	Linaje		
	Endodermo	Mesodermo	Ectodermo
Miki, et al. ³⁷	Células pancreáticas	Cardiomiocitos	Células neurales
Ilancheran, et al. ⁵	Células pancreáticas Células hepáticas	Miocitos Osteocitos Adipocitos Cardiomiocitos	Células neurales
Kim, et al. ³⁶	–	Adipocitos Osteocitos Condrocitos	Células neurales
Bilic, et al. ³⁵	–	Osteocitos Miocitos Adipocitos	–
Murphy, et al. ⁴⁵	Células del epitelio pulmonar	Osteocitos Adipocitos	Células neurales Células gliales
Pratama, et al. ⁴¹	Células del epitelio alveolar Células pancreáticas Células hepáticas	Osteocitos Condrocito	–
Marongiu, et al. ⁷⁶	Células hepáticas	–	–
Fant, et al. ⁷⁷	–	Cardiomiocitos	–

crecimiento. Se adhieren al plástico y a frascos cubiertos con membrana basal u otros materiales en medios convencionales, como ya se ha comentado. No obstante, se han propuesto como un nicho sustituto para el mantenimiento de CT de diferentes orígenes⁵⁴. De esta manera, se ha demostrado que las células epiteliales limbares⁵⁵, las CT derivadas del epiblasto (EpiSC)⁵⁶, las iPSC^{57,58} y las células troncales provenientes de la espermatogonia (CTS)⁵⁹ son cultivadas de manera exitosa usando CEAh como sustrato de cultivo. En el caso particular de las CTS, la expresión de Nanog y Oct-4 es más alta en células cultivadas sobre CEAh que en aquellas cultivadas en MEF o con otro tipo celular⁶⁰. Asimismo, el grupo de Lai utilizó las CEAh para mantener en estado indiferenciado CTE murinas, y reportaron que las CTE expresaban 3-5 veces más FGF, Oct-4, Nanog, Sox-2 y Rex que las células sembradas en MEF, mediante la técnica de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real; los autores sugirieron que estos efectos pudieron deberse a la producción del *leukemia inhibitory factor* (LIF)⁶¹. Por otra parte, Liu, et al. reportaron la obtención de iPSC humanas sobre CEAh, efecto mediado por el micro-ARN-145 al incrementar los niveles de Sox-2 en las células reprogramadas⁵⁷.

Propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y de baja respuesta inmunológica de las células derivadas de la membrana amniótica

Las células derivadas del amnios han sido consideradas como un tejido ideal para el alotransplante, con base en sus efectos antiinflamatorios y de baja respuesta inmunológica. Se ha reportado que las CEAh expresan varios marcadores antiangiogénicos y proteínas antiinflamatorias, como el antagonista del receptor a interleucina 1, inhibidores de las metaloproteasas 1, 2, 3 y 4 e interleucina 10⁶². Asimismo, suprimen las isoformas del factor de crecimiento tumoral β y a su receptor tipo II, lo cual desencadena el depósito de colágeno en el sitio de la lesión y la fibrosis⁶³.

También se ha descrito que las β -defensinas son un grupo de péptidos antimicrobianos secretados por las células epiteliales de las mucosas y del amnios, las cuales son una parte integral del sistema inmune innato⁶⁴.

Por lo que se refiere a la baja respuesta inmunológica, no se han reportado signos de rechazo cuando la membrana amniótica ha sido trasplantada en voluntarios sin enfermedad adyacente⁶⁵. Por otra parte, las

células del amnios expresan el antígeno no polimórfico HLA-G, pero carecen de los antígenos polimórficos HLA-A, B (clase A) y HLA-DR (clase B)⁶⁶. Esta característica les confiere una ventaja inmunológica al disminuir el riesgo de rechazo al ser trasplantadas.

Finalmente, cabe mencionar que la membrana amniótica humana es una fuente biológica, no costosa, de matriz para cultivo celular. Asimismo, se ha descrito la expresión de varios factores de crecimiento y citosinas (EGF, *keratinocyte growth factor* [KGF], *hepatocyte growth factor* [HGF], *basic fibroblastic growth factor* [bFGF], TGF- α , transforming growth factor- β [TGF- β -2], bone morphogenetic growth protein-4 [BMP-4], etc.)⁶⁷.

Conclusiones

La información aquí presentada sugiere que las CEAh tienen características similares a las CT pluripotentes, las cuales podrían ser excelentes candidatas para el uso en terapias de reemplazo celular. Asimismo, su derivación no tiene problemas éticos, son células que no forman teratomas al trasplantarse en estado indiferenciado, no presentan respuesta inmune y presentan propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. Sin embargo, queda mucho camino por recorrer, ya que son células con poblaciones heterogéneas, y los protocolos reportados para su aislamiento son diversos; por lo tanto, se requiere seguir investigando para poder caracterizarlas.

Agradecimientos

Este trabajo ha recibido el apoyo del CONACYT (140917 y 130627) y el INPER (212250-21041 y 212250-21081) para Fabián Díaz-Martínez; Irma Lydia García-Castro (213945) y Daniela Ávila-González (231731) son becarias del CONACYT.

Guadalupe García-López se encuentra cursando el Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM. Agradecemos al Dr. Federico Martínez-Montes y al Dr. Héctor Mayani-Viveros por su valiosa revisión y sugerencias que hicieron acerca de este trabajo lo cual ayudó a mejorar su calidad.

Bibliografía

1. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(2): 189-92.
2. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.* 2009;30(3):204-13.
3. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-16.

4. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology.* 2008;58(1):33-42.
5. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod.* 2007;77(3):577-88.
6. Chen CP, Liu SH, Huang JP, et al. Engraftment potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells after in utero transplantation in rats. *Hum Reprod.* 2009;24(1):154-65.
7. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-6.
8. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7634-8.
9. Pereira Fde A, Tavares RL, Camargos AF, da Silva Filho AL. Telomerase activity alterations in sequential passages of mouse embryonic stem cells. *Cell Biol Int.* 2012;36(8):755-7.
10. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7844-8.
11. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
12. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* 1984;309(5965):255-6.
13. Artus J, Hadjantonakis AK. Generation of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2011;693:37-56.
14. Lin CJ, Amano T, Zhang J, Chen YE, Tian XC. Acceptance of embryonic stem cells by a wide developmental range of mouse tetraploid embryos. *Biol Reprod.* 2010;83(2):177-84.
15. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006;27(2):208-19.
16. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010;143(4):508-25.
17. Chenoweth JG, McKay RD, Tesar PJ. Epiblast stem cells contribute new insight into pluripotency and gastrulation. *Dev Growth Differ.* 2010;52(3):293-301.
18. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010;24(20):2239-63.
19. Teoh HK, Cheong SK. Induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Malays J Pathol.* 2012;34(1):1-13.
20. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):497-505.
21. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9499-503.
22. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med.* 2007;58:299-312.
23. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-68.
24. Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2007;25(5):665-77.
25. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.
26. López-Cruz G M-RJ, Gaván-Espinosa H, Sosa-Vásquez J, Reyes-Hernández U. Estudio de la placenta. I. Correlación: Peso del recién nacido y peso placentario. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2009;26(1):8-12.
27. Bourne G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J.* 1962;38:193-201.
28. Benirschke K KP. Anatomy and Pathology of the placental membranes. En: *Pathology of the human Placenta.* 4.^a ed. Nueva York; 2000. p. 281-334.
29. Fu G, Brkic J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):5519-44.
30. Can A, Karahuseynoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(11):2886-95.
31. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.* 2012;349(2):447-58.
32. Takaoka K, Hamada H. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development.* 2012;139(1):3-14.
33. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(3):25.
34. Dunnebacke TH, Zitcer EM. Preparation and cultivation of primary human amnion cells. *Cancer Res.* 1957;17(11):1043-6.
35. Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transpl.* 2008;17(8):955-68.
36. Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2007;9(4):581-94.

37. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1549-59.
38. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 1996;209(1):9-12.
39. Venkatachalam S, Palaniappan T, Jayapal PK, Neelamegan S, Rajan SS, Muthiah VP. Novel neurotrophic factor secreted by amniotic epithelial cells. *Biocell*. 2009;33(2):81-9.
40. Yang XX, Xue SR, Dong WL, Kong Y. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparinsonian rats. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(20):2449-54.
41. Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, et al. Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *PLoS One*. 2011;6(11):e26136.
42. Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010;Chapter 1:Unit 1E.3.
43. Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013;153(6):1228-38.
44. Gavrilov S, Marolt D, Douglas NC, et al. Derivation of two new human embryonic stem cell lines from nonviable human embryos. *Stem Cells Int*. 2011;2011:765378.
45. Murphy S, Rosli S, Acharya R, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010;Chapter 1:Unit 1E.6.
46. Whittle WL, Gibb W, Challis JR. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*. 2000;21(4):394-401.
47. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. 2007;75(2):91-6.
48. Bibikova M, Laurent LC, Ren B, Loring JF, Fan JB. Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):123-34.
49. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 2009;136(14):2311-22.
50. Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, et al. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(2):161-71.
51. Thatte S, Gupta L. Amniotic membrane transplantation in surgically induced necrotizing scleritis with peripheral ulcerative keratitis. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2012;19(4):419-21.
52. Clare G, Suleman H, Bunce C, Dua H. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD009379.
53. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell*. 2004;17(3):125-30.
54. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(6):631-46.
55. Rendal-Vazquez ME, San-Luis-Verdes A, Yebra-Pimentel-Vilar MT, et al. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(3):513-9.
56. Chen YF, Dong Z, Jiang L, Lai D, Guo L. Mouse primed embryonic stem cells could be maintained and reprogrammed on human amnion epithelial cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(2):320-9.
57. Liu T, Cheng W, Huang Y, Huang Q, Jiang L, Guo L. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain human iPS cell pluripotency via inhibited endogenous microRNA-145 and increased Sox2 expression. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):424-34.
58. Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, et al. Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Hum Mol Genet*. 2011;20(5):962-74.
59. Liu T, Guo L, Liu Z, Cheng W. Human amniotic epithelial cells maintain mouse spermatogonial stem cells in an undifferentiated state due to high leukemia inhibitor factor (LIF) expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(4):318-26.
60. Liu T, Huang Y, Huang Q, Jiang L, Guo L, Liu Z. Use of human amniotic epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse spermatogonial stem cells via epigenetic regulation of the Nanog and Oct-4 promoters. *Acta Biol Hung*. 2012;63(2):167-79.
61. Lai D, Cheng W, Liu T, Jiang L, Huang Q, Liu T. Use of human amnion epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2009;11(2):331-40.
62. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348-52.
63. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1999;179(3):325-35.
64. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007;28(2-3):161-9.
65. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;2(8254):1003-5.
66. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*. 2005;19(7):681-93.
67. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000;20(3):173-7.
68. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-82.
69. Raisanen S, Gissler M, Saari J, Kramer M, Heinonen S. Contribution of risk factors to extremely, very and moderately preterm births - register-based analysis of 1,390,742 singleton births. *PLoS One*. 2013;8(4):e60660.
70. Minas V, Mylonas I, Schiessl B, et al. Expression of the blood-group-related antigens Sialyl Lewis x, Sialyl Lewis x and Lewis y in term placentas of normal, preeclampsia, IUGR- and HELLP-complicated pregnancies. *Histochem Cell Biol*. 2007;128(1):55-63.
71. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(2):300-11.
72. Banas RA, Trumpower C, Bentlejewska K, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol*. 2008;69(6):321-8.
73. Stadler G, Hennerbichler S, Lindenmair A, et al. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation in vitro. *Cytotherapy*. 2008;10(7):743-52.
74. Fatimah SS, Ng SL, Chua KH, Hayati AR, Tan AE, Tan GC. Value of human amniotic epithelial cells in tissue engineering for cornea. *Hum Cell*. 2010;23(4):141-51.
75. Maguire CT, Demarest BL, Hill JT, et al. Genome-wide analysis reveals the unique stem cell identity of human amniocytes. *PLoS One*. 2013;8(1):e53372.
76. Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, et al. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology*. 2011;53(5):1719-29.
77. Fang CH, Jin J, Joe JH, et al. In vivo differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1687-96.