

Aislación y Caracterización de las Células Epiteliales del Amnios

Isolation and Characterization of Amniotic Epithelial Cells

Cristina Bucchi¹ & Josep Maria de Anta²

BUCCHI, C. & DE ANTA, J. M. Aislación y caracterización de las células epiteliales del amnios. *Int. J. Morphol.*, 40(3):817-823, 2022.

RESUMEN: Las células epiteliales del amnios (hAECs) son células madre pluripotenciales; tienen capacidad de diferenciarse en células de las tres capas embrionarias. Como tales, se utilizan en algunas terapias regenerativas en medicina. Este estudio tiene por objetivo describir un protocolo de aislamiento de las células epiteliales del amnios (hAECs) a partir de placentas humanas de partos por cesárea, así como su caracterización y comportamiento *in vitro*. Se aislaron hAECs de 20 placentas de partos por cesárea con un protocolo optimizado. Se caracterizaron las células mediante citometría de flujo, microscopía óptica y de fluorescencia, y se evaluó la proliferación de las células mediante MTT a los 1, 3, 5 y 7 días con y sin b-mercaptoetanol en el medio de cultivo. El análisis histológico del amnios mostró un desprendimiento prácticamente completo de las células después de la segunda digestión del amnios. El promedio de células obtenidas fue de 10.97 millones de células por gramo de amnios. Las hAECs mostraron una proliferación limitada, la cual no fue favorecida por la adición de b-mercaptoetanol en el cultivo. Se observó un cambio de morfología espontánea de epitelial a mesenquimal después del cuarto pasaje. Las células epiteliales del amnios pueden ser aisladas con un protocolo simple y efectivo, sin embargo, presentan escasa capacidad proliferativa. Bajo las condiciones de este estudio, la adición de b-mercaptoetanol no favorece la capacidad proliferativa de las células.

PALABRAS CLAVE: Células epiteliales del amnios; Células pluripotentes; Protocolo de aislamiento.

INTRODUCCIÓN

El amnios es una membrana delgada, compuesta por células epiteliales cuboidales y columnares, que rodea la superficie interna de la placenta. Tiene un origen epiblastico (Miki *et al.*, 2005), es avascular y en su superficie materna se mantiene adherido a la lámina basal, compuesta por proteínas extracelulares y por células madre mesenquimales dispersas.

Las células epiteliales del amnios (hAECs), contenidas en el amnios, expresan marcadores de célula madre pluripotencial; tienen capacidad de diferenciarse en células de las tres capas embrionarias (Murphy *et al.*, 2010; García-Castro *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las células epiteliales del amnios tienen potencial de diferenciación adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico, cardiomiogénico, neurogénico, pancreático y hepatogénico, entre otros (Parolini *et al.*, 2008).

Entre las ventajas de las hAECs destaca que muestran un cariotipo normal y no son tumorigénicas después del trasplante (Miki & Strom, 2006; Murphy *et al.*, 2010), tienen un poder inmunogénico bajo y poseen potentes propiedades inmunosupresoras (Murphy *et al.*). Estas células son capaces además de inducir la angiogénesis y la epitelización (Tseng *et al.*, 1997), de reducir la inflamación (Shimmura *et al.*, 2001), y poseer propiedades antimicrobianas y antivirales (Kjaergaard *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2001).

En 2011, Marongiu *et al.* (2011) demostraron que las hAECs de rata tenían la capacidad de diferenciarse en hepatocitos después de ser inyectadas al sistema vascular hepático, es decir, eran capaces de diferenciarse a hepatocitos *in vivo* sin necesidad de un proceso de diferenciación previa *in vitro*. Otros estudios posteriores han demostrado la utili-

¹ Departamento Odontología Integral Adultos, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Unidad de Anatomía y Embriología Humana, Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

dad de las hAECs como potenciales sustitutos de hepatocitos en pacientes con enfermedades hepáticas metabólicas (Skvorak *et al.*, 2013), por lo que hoy en día se plantea como una terapia clínica (Lim *et al.*, 2017). Asimismo, debido al potencial de diferenciación de las hAECs y demás características biológicas descritas anteriormente, se están conduciendo diversos ensayos para aplicarlas terapias regenerativas en medicina. Actualmente, además de terapias hepáticas, se están conduciendo ensayos clínicos contra la parálisis cerebral espástica, superficies oculares dañadas, fracturas, síndrome de Asherman, insuficiencia ovárica, entre otras patologías (www.clinicaltrials.gov).

Considerando el potencial regenerador de las hAECs, sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, así como el hecho de que se obtiene de un tejido de descarte (placenta), este artículo tiene por objetivo describir un protocolo de aislación de las hAECs a partir de placentas humanas de partos por cesárea, así como su caracterización y comportamiento *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODO

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Barcelona y siguió los principios de la Declaración de Helsinki. El método que se describe a continuación reúne la experiencia de la aislación de células epiteliales del amnios de 20 placentas humanas, obtenidas inmediatamente después de partos por cesárea, y optimiza métodos de aislación reportados previamente (Gramignoli *et al.*, 2016). Todas las pacientes firmaron el consentimiento informado horas antes de la cirugía.

Protocolo de aislación de las células epiteliales del amnios

1. Previo a la aislación de las células, se debe solicitar la aprobación del proyecto con el comité ético local y establecer una colaboración con un hospital local que realice partos por cesárea. Para obtener el amnios, es preferible el parto por cesárea al parto natural debido a consideraciones éticas (la paciente no sufre dolor al momento de la aplicación del consentimiento informado), y por la disminución de las probabilidades de contaminación en el cultivo celular primario, al obtener la placenta por vía quirúrgica y no por vía vaginal.
2. Preparar el flujo de cabina con los siguientes materiales: bandeja metálica, bisturí y hoja de bisturí, tijera y 4 vasos de precipitado de 300 ml. Todo el material debe estar esterilizado.
3. Inmediatamente después del parto, se debe depositar la placenta en un recipiente estéril no traslucido con solución salina, de manera que la placenta quede cubierta completamente por la solución. Se debe sellar el recipiente y transportarlo a 4 °C al laboratorio donde se aislarán las células.
4. Una vez en el laboratorio, se debe desinfectar la cara exterior del recipiente con etanol al 70 %, antes de introducirlo en la cabina de flujo.
5. Con guantes estériles se coge la placenta y se deposita en la bandeja metálica con el funículo umbilical hacia arriba (Fig. 1A). Al contrario de lo reportado en estudios previos (Gramignoli *et al.*), no se debe lavar la placenta en el recipiente, pues la importante cantidad de sangre dificultará un lavado eficaz, requerirá tiempo considerable y conllevará una manipulación excesiva de la placenta. Una vez depositada la placenta en la bandeja metálica, se debe retirar el recipiente fuera de la cabina.
6. Al contrario de lo reportado en estudios previos (Gramignoli *et al.*), no se recomienda cortar el cordón umbilical. Dado que el funículo umbilical contiene dos arterias y una vena, si se corta, se producirá una extravasación significativa de sangre, lo que dificultará el procedimiento de aislamiento celular.
7. Con el bisturí se debe hacer un corte superficial que circunscriba el funículo umbilical a aproximadamente 1 cm del tallo. Posteriormente, hacer cuatro cortes lineales, cada uno desde el corte que rodea el funículo umbilical hasta la parte más lateral de la placenta.
8. Con los dedos se debe separar y levantar el amnios de la placenta (Fig. 1B). Se debe evitar la manipulación excesiva del tejido.
9. Depositar las membranas de amnios en un vaso de precipitado con 200 ml de solución Ringer Ph 6,5 (Fig 1C.) para disolver los coágulos de sangre. Agite suavemente el amnios con una pinza para eliminar los coágulos de sangre que se encuentran adherida a la membrana. Debido al pH ácido, los amnios no deben estar en contacto con la solución de Ringer durante más de 10 a 15 minutos (Gramignoli *et al.*).
10. Cambie los trozos de amnios a vasos de precipitados sucesivos, cada uno con 200 ml de PBS (Ph 7,4). Realice tantos cambios de vasos como sea posible hasta que los trozos de amnios estén libre de sangre y la solución se observe transparente (Fig. 1C). Se necesitarán al menos tres cambios de PBS para limpiar la membrana.
11. Colocar 10 g de tejido en 10 ml de solución Tryple x 10 en un tubo Falcon de 50 ml.
12. Incubar el amnios a 37 °C y 5 % CO₂ durante 20 minutos. De preferencia utilizar incubador que realice agitación, de lo contrario se debe agitar manualmente los tubos cada 3 minutos para facilitar el proceso de liberación de células de su membrana subyacente.
13. Vaciar el contenido de los tubos en un vaso de precipitado de 200 ml de PBS cada 10 ml de TrypleX10.

14. Realizar un segundo proceso de digestión de la membrana. Para esto se debe poner nuevamente 10 g de tejido en 10 ml de solución Tryplex10 en un tubo Falcon de 50 ml, a incubar a 37 °C y 5 % CO₂ durante 20 minutos.
15. Vaciar el contenido de los tubos en el vaso de precipitado donde se encuentran las células del primer proceso de digestión de la membrana.
16. Centrifugar las células a 300 g x 10 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en el medio de cultivo.

Caracterización de las hAECs. Se llevó a cabo un análisis con citometría de flujo para caracterizar las células aisladas. Inmediatamente después del aislamiento, las hAEC se sembraron en frascos T-75 y se cultivaron hasta una confluencia del 80 % con DMEM, 2nM de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 10 % de FBS y 10 ng/ml de EGF. Las células (1x10⁵ células / tubo con 83 µl de suspensión celular) se incubaron con 4 µl de CD44 antihumano de ratón (APC; 560890, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), 4 µl de CD105 antihumano de ratón (PerCP- CY 5.5; 562245, BD Biosciences), 4 µl de anti-EpCAM (FITC; 347197, BD Biosciences) y 4 µl de anti-CD49f humano de rata (PE; 561894, BD Biosciences). El análisis se realizó en un citómetro de flujo (FACSCanto™, BD Biosciences) y la adquisición de datos y los análisis se realizaron con el software FACSDiva™ (BD Biosciences) con al menos 10 000 eventos por muestra. Las células de dos donantes diferentes se analizaron por triplicado y se calcularon los valores medios con percentiles del 25 % al 75 % (n = 6).

Observación microscópica de las hAECs. Después de 7 días en cultivo con el medio descrito anteriormente, las células se fijaron con formalina durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X 0,1 % durante 5 min y se teñieron con Phalloidin (30 min) y DAPI (1 min). Las células fueron observadas en un microscopio ZEISS (Axio

Vert.A1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania) y fotografiadas con la cámara ZEISS AxioCam 503 (Microscopía Carl Zeiss, Jena, Alemania). Se tomaron imágenes con filtro de fluorescencia azul y roja (juego 43, Microscopía Carl Zeiss, Jena, Alemania) de forma independiente y posteriormente superpuestas digitalmente. Se utilizó el software ZEN para microscopía e imágenes (v 3.1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania).

Procesamiento histológico del amnios. Trozos de amnios previo a la primera digestión, posterior a la primera digestión y posterior a la segunda digestión fueron analizados histológicamente. Para ello, se fijaron los trozos de tejido en formalina al 10 % por 24 horas. Posteriormente, las muestras se procesaron con un procesador de tejidos (Shandon Citadel 1000; Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.); se deshidrataron mediante gradaciones ascendentes de etanol de la siguiente manera: un ciclo de etanol al 70 % (8 h), un ciclo de 90 % de etanol (8 h), tres ciclos de etanol al 100 % (8, 16 y 14 h), tres ciclos de xileno (5, 5 y 6 h) y dos ciclos de parafina (6 y 16 h). Las muestras se seccionaron con un micrótopo Leica Jung RM2045 (Leica, Nussloch, Baden-Württemberg, Alemania). Se obtuvieron cortes de 5 µm y se colocaron en portaobjetos con poli-L-lisina. El utilizó hematoxilina y eosina (H-E) como tinción, y se observaron las muestras mediante microscopía óptica (Olympus CH30; Olympus, Tokio, Japón).

Cultivo y proliferación de hAECs. Se sembraron 3000 hAECs por pocillo en placas de 96 pocillos con el medio control (Dubeccos Modified Eagle Medium (DMEM), 2nM de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y con el medio experimental, que contenía b-mercaptoetanol (DMEM, 2nM de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 10 % de FBS 10 ng/ml de EGF y 55 µM b-mercaptoetanol) en un incubador a 37 °C.



Fig. 1. Placenta obtenida de un parto por cesárea. Para separar el amnios de la placenta se debe ubicar el cordón umbilical hacia arriba (A), coger la membrana, que se observará transparente, con los dedos (B) y depositarla en vasos de precipitado con solución Ringer (Ph 6.5) para disolver los coágulos de sangre (C).

Se realizó un ensayo MTT después de 1, 3, 5 y 7 días. Después de la incubación de las células con bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT; 0,5 mg/ml) (Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 60 min a 37 °C y 5 % de CO₂, el colorante se disolvió con DMSO durante 180 min en un agitador de placas a 220 rpm. La absorbancia se midió en un lector de microplacas a $\lambda = 540$ nm (Infinite® 200, Tecan, Männedorf, Suiza).

RESULTADOS

Histología del amnios. Posterior a la separación del amnios del corion subyacente y previo al proceso de digestión se observa un epitelio de células cilíndricas organizadas en una monocapa homogénea sobre la membrana basal (Fig. 2A). Las células presentan un núcleo único dispuesto mayoritariamente en el polo distal de la célula (Fig. 2A).

La primera digestión de la membrana da lugar a un desprendimiento parcial de las células (Fig. 2B). La segunda digestión da lugar a un desprendimiento prácticamente total de las células (Fig. 2C), por lo que resulta necesario realizar dos procesos de digestión para un aislamiento efectivo. Posterior al segundo proceso de digestión la membrana se observa íntegra (Fig. 2C).

Recuento de las células aisladas. El promedio de células aisladas tras la primera digestión fue de $8,06 \pm 0,7 \times 10^7$ células por gramo de amnios con una viabilidad del 81,3 %. El promedio de las células aisladas tras la segunda digestión fue de $2,91 \pm 0,9 \times 10^7$ células por gramo de amnios con una viabilidad del 70,1 %.

Caracterización mediante citometría. El análisis mediante citometría de flujo mostró que las células aisladas ex-

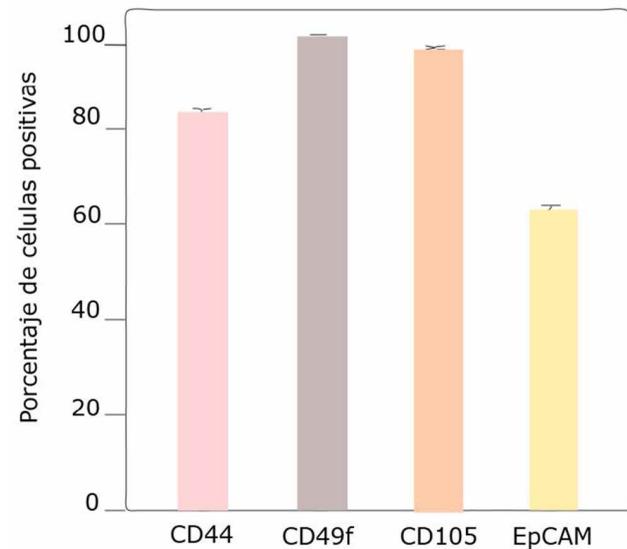


Fig. 3. Resultado de la citometría de flujo. Las hAECs mostraron ser positivas para marcadores de células mesenquimales y epiteliales.

presaban tanto marcadores epiteliales (CD49f, CD326 o EpCAM) como marcadores mesenquimales (CD105, CD44) (Fig. 3).

Cultivo y expansión *in vitro*. Tras 24 horas de cultivo se observó una población incipiente y pura de células adherentes de aspecto redondeado con un núcleo claramente observable al microscopio óptico (Fig. 4A). El tamaño celular es cercano a 100 μ m. La morfología celular es confirmada mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 4B), se observa un nucléolo por célula.

Según la experiencia obtenida las hAECs presentan una transición mesenquimal a partir del cuarto pasaje. Cuando son sembradas a baja confluencia, esta transición se observa en pasajes menores (segundo o tercer pasaje).

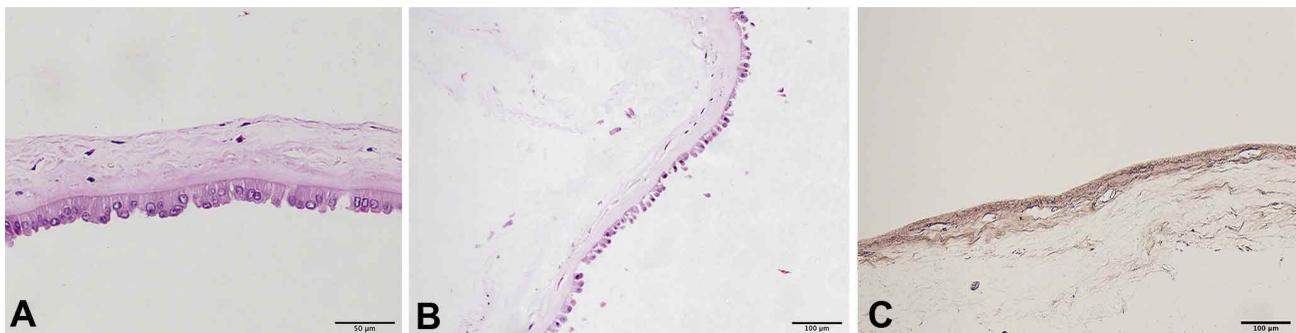


Fig. 2. Histología (H-E) del amnios previo a la digestión (A), tras 20 minutos de digestión con Tryple x 10 (B) y tras 40 minutos de digestión con Tryple x 10. Tras los primeros 20 minutos de digestión se observa un desprendimiento parcial de células (B) y tras 40 minutos el desprendimiento es completo (C).

La adición de beta-mercaptoetanol al cultivo no dio lugar a una diferencia estadísticamente significativa en la proliferación celular (Fig. 5). Sin embargo, la tripzinización

de las células cultivadas con medio con beta-mercaptoetanol requirió un mayor tiempo (aproximadamente 2 minutos más) y no resultó completamente efectiva.

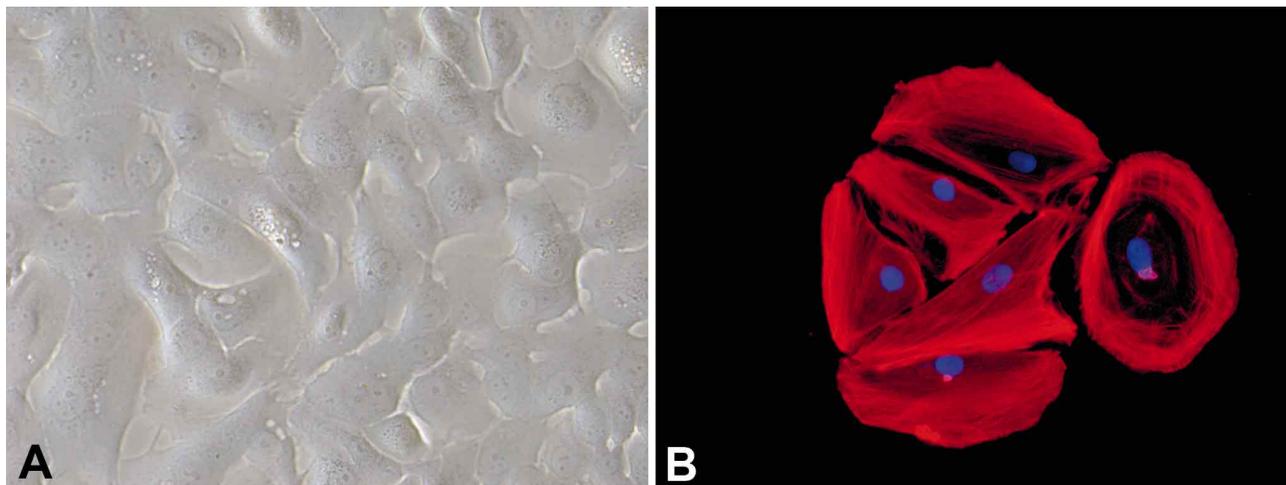


Fig. 4. Cultivo de hAECs observadas con microscopía óptica (A) y microscopía de fluorescencia (B). Las hAECs presentan una morfología redondeada con núcleo único (A, B).

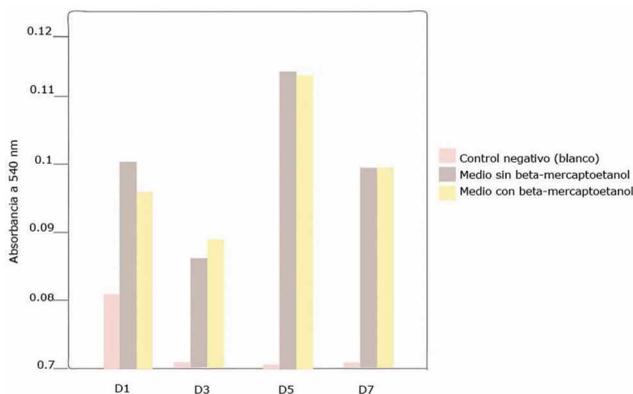


Fig. 5. Resultado del test MTT tras 1, 3, 5 y 7 días de cultivo con y sin beta-mercaptoetanol. La adición de beta-mercaptoetanol en el medio no favoreció la proliferación celular.

DISCUSIÓN

Este estudio presenta un método simple y efectivo para el aislamiento y cultivo de células epiteliales de amnios humanos. Nuestros resultados indican que se puede obtener un cultivo puro de células, las que son liberadas en su total del amnios después de la segunda digestión, y que al ser cultivadas *in vivo* presentan una capacidad de proliferación limitada.

Las hAECs son células madre que a diferencia de otros componentes de la placenta, derivan del epiblasto en las primeras semanas de la embriogénesis (Miki *et al.*, 2005),

y tienen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas embrionarias. Además, se obtienen del amnios, que suele desecharse después del nacimiento y por tanto no generan controversia sobre la preocupación ética (Miki, 2018). Otra ventaja de las hAEC es que, a diferencia de las células madre embriónicas, no son tumorigénicas tras el trasplante y tienen pocas propiedades inmunogénicas (Miki). Por estas razones, se han utilizado ampliamente en medicina regenerativa (Marongiu *et al.*).

En cuanto a su morfología, la literatura es bastante homogénea en indicar que tienen una morfología epitelial típica (redondeadas), de gran tamaño (diámetro 100 μm aproximadamente) y con núcleo único, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, en la literatura se reporta que el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie de las hAECs tiene una alta variación en el tipo y cantidad de marcadores expresados (Miki). Se ha reportado que el epitelio amniótico a término contiene hAECs con varios grados de expresión de marcadores de pluripotencialidad (Miki). Los resultados de este estudio indican que las células son positivas para marcadores mesenquimales (CD105 y CD44) y epiteliales (EpCAM y CD49f). La positividad a los marcadores mesenquimales para las hAECs ha sido reportada en estudios previos (Topoluk *et al.*, 2017).

En la literatura es posible observar distintos protocolos de aislamiento de células epiteliales del amnios, que varían en cuanto la manipulación de la membrana y las enzimas utilizadas para separar las células de la membrana subya-

cente (Murphy *et al.*; Gramignoli *et al.*; Maymó *et al.*, 2018). Este estudio demuestra que es posible evitar la limpieza de la membrana mientras esta se encuentre adherida a la placenta. Esto reduce la manipulación de la membrana, facilita la limpieza del amnios y el posterior desprendimiento de la totalidad de las células sin la interferencia de sangre, después de la segunda digestión. Así también se observa diferencias en la literatura con respecto al medio de cultivo de las células, ya que algunos estudios adicionan b-mercaptoetanol en el cultivo (Miki *et al.*). La justificación de la adición de b-mercaptoetanol estaría dada en la acción anti-estrés oxidativo de las células, lo que favorecería la proliferación celular. Sin embargo, según lo observado en este estudio el β -mercaptoetanol no favoreció la proliferación celular y, por el contrario, aumentó el tiempo de tripsinización de las células cuando estas eran pasadas de un pasaje a otro. Se ha demostrado que, al contrario de las células madre mesenquimales del amnios, las células epiteliales del amnios tienen una alta resistencia al estrés oxidativo (Han *et al.*, 2019), por lo que, tal como lo demostrado en este estudio, el uso de b-mercaptoetanol no sería necesario para el cultivo de las hAECs.

En este estudio se observó que las hAECs son células poco proliferativas, lo concuerda con estudio previos que señalan que las hAECs muestran una proliferación lenta que prácticamente se detiene al pasaje 5 (Bilic *et al.*, 2008). Esta proliferación limitada de las hAECs se explica debido a que carecen telomerasa transcriptasa inversa (Bilic *et al.*), lo que debe ser considerado cuando se planea utilizarlas en terapias regenerativas o estudios *in vitro* que requieran un alto número de células. Así mismo, el cambio espontáneo de una morfología epitelial a mesenquimal observada en este estudio a partir del cuarto pasaje ha sido también reportada en estudios previos (Bilic *et al.*). Esto ha sido explicado ya que estas células presentan algo grado de respuesta y plasticidad a estímulos externos, incluso en aquellas células que han perdido la capacidad de expresar marcadores de células madre.

CONCLUSIÓN

Las células epiteliales del amnios pueden ser aisladas con un protocolo simple y efectivo, sin embargo, presentan escasa capacidad proliferativa. La adición de b-mercaptoetanol no favorece la capacidad proliferativa de las células.

AGRADECIMIENTOS. Proyecto DIUFRO EP DI19-0024, Dirección de Investigación, Universidad de La Frontera, Chile.

BUCCHI, C. & DE ANTA, J. M. Isolation and characterization of amniotic epithelial cells. *Int. J. Morphol.*, 40(3):817-823, 2022.

ABSTRACT: human amnion epithelial cells (hAECs) are pluripotent stem cells; they have the ability to differentiate into cells of the three embryonic layers, and are used in various regenerative therapies in medicine. This study aims to describe a protocol for the isolation of amnion epithelial cells (hAECs) from human placentas from cesarean delivery, as well as their characterization and culture conditions *in vitro*. hAECs were isolated from 20 cesarean delivery placentas with an optimized protocol. The cells were characterized by flow cytometry, light and fluorescence microscopy, and the proliferation of the cells was evaluated by MTT at 1, 3, 5 and 7 days with and without b-mercaptoethanol in the culture medium. Histological analysis of the amnion showed a practically complete detachment of the cells of the underlying membrane after the second digestion. The average number of cells obtained was 10.97 million cells per amnion. The hAECs perform a limited proliferation rate, which was not favored by the addition of b-mercaptoethanol in the culture. A spontaneous morphology change from epithelial to mesenchymal morphology is exhibited after the fourth passage. The epithelial cells of the amnion can be isolated with a simple and effective protocol, however, they present little proliferative capacity. Under the conditions of this study, the addition of b-mercaptoethanol does not favor the proliferation of the cells.

KEY WORDS: human amnion epithelial cells, pluripotent cells, isolation protocol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bilic, G.; Zeisberger, S. M.; Mallik, A. S.; Zimmermann, R. & Zisch, A. H. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant.*, 17(8):955-68, 2008.
- García-Castro, I. L.; García-López, G.; Ávila-González, D.; Flores-Herrera, H.; Molina-Hernández, A.; Portillo, W.; Ramón-Gallegos, E. & Díaz, N. F. Markers of pluripotency in human amniotic epithelial cells and their differentiation to progenitor of cortical neurons. *PLoS One*, 10(12):e0146082, 2015.
- Gramignoli, R.; Srinivasan, R. C.; Kannisto, K. & Strom, S. C. Isolation of human amnion epithelial cells according to current good manufacturing procedures. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, 37:1E.10.1-1E.10.13, 2016.
- Han, L. G.; Zhao, Q. L.; Yoshida, T.; Okabe, M.; Soko, C.; Rehman, M. U.; Kondo, T. & Nikaido, T. Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 135:79-86, 2019.
- Kjaergaard, N.; Hein, M.; Hyttel, L.; Helmig, R. B.; Schönheyder, H. C.; Uldbjerg, N. & Madsen, H. Antibacterial properties of human amnion and chorion *in vitro*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 94(2):224-9, 2001.
- Kubo, M.; Sonoda, Y.; Muramatsu, R. & Usui, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42(7):1539-46, 2001.
- Lim, R.; Hodge, A.; Moore, G.; Wallace, E. M. & Sievert, W. A pilot study evaluating the safety of intravenously administered human amnion epithelial cells for the treatment of hepatic fibrosis. *Front. Pharmacol.*, 8:549, 2017.

- Marongiu, F.; Gramignoli, R.; Dorko, K.; Miki, T.; Ranade, A. R.; Paola Serra, M.; Doratiotto, S.; Sini, M.; Sharma, S.; Mitamura, K.; *et al.* . Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology*, 53(5):1719-29, 2011.
- Maymó, J. L.; Riedel, R.; Pérez-Pérez, A.; Magatti, M.; Maskin, B.; Dueñas, J. L.; Parolini, O.; Sánchez-Margalet, V. & Varone, C. L. Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation. *PLoS One*, 13(1):e0191489, 2018.
- Miki, T. & Strom, S. C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.*, 2(2):133-42, 2006.
- Miki, T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 80(4):e13003, 2018.
- Miki, T.; Lehmann, T.; Cai, H.; Stolz, D. B. & Strom, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23(10):1549-59, 2005.
- Murphy, S.; Rosli, S.; Acharya, R.; Mathias, L.; Lim, R.; Wallace, E. & Jenkin, G. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol., Chapter 1:Unit 1E.6*, 2010.
- Parolini, O.; Alviano, F.; Bagnara, G. P.; Bilic, G.; Bühring, H. J.; Evangelista, M.; Hennerbichler, S.; Liu, B.; Magatti, M.; Mao, N.; *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*, 26(2):300-11, 2008.
- Shimmura, S.; Shimazaki, J.; Ohashi, Y. & Tsubota, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*, 20(4):408-13, 2001.
- Skvorak, K. J.; Dorko, K.; Marongiu, F.; Tahan, V.; Hansel, M.C.; Gramignoli, R.; Gibson, K. M. & Strom, S. C. Placental stem cell correction of murine intermediate maple syrup urine disease. *Hepatology*, 57(3):1017-23, 2013.
- Topoluk, N.; Hawkins, R.; Tokish, J. & Mercuri, J. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *Am. J. Sports Med.*, 45(11):2637-46, 2017.
- Tseng, S. C. G.; Prabhasawat, P. & Lee, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am. J. Ophthalmol.*, 124(6):765-74, 1997.

Dirección para correspondencia:
Prof. Dra. Cristina Bucchi
Facultad de Odontología
Universidad de La Frontera
Temuco
CHILE

E-mail: cristina.bucchi@ufrontera.cl