

**“Generación de protocolos para la obtención y cultivo de células epiteliales
a partir de Membrana Amniótica Humana para su uso en medicina
regenerativa”**

**Tesis para Optar al Grado de Licenciado/a
En Obstetricia y Puericultura**

2011

Autores: Guicelle Aravena Garín.
Bárbara Figueroa Canales.
Paola Quezada Meezs.
Marlene Riegel Pérez.
Patricia Rodríguez González.

Profesores Guías: Mario Párraga San Román.
Sebastián San Martín Henríquez
Joan Villena García.

Agradecimientos.

La realización de esta tesis ha sido un trabajo de mucho esfuerzo, en el cual, directa o indirectamente participaron muchas personas que contribuyeron para llegar al término.

Agradecemos en primer lugar a nuestras familias, quienes han sido un apoyo constante a lo largo de toda nuestra formación profesional y quienes fueron el pilar fundamental para mantenernos en pie durante este difícil desafío.

Agradecemos a nuestros profesores guías, Dr. Sebastián San Martín, Dr. Joan Villena y Dr. Mario Párraga, quienes acogieron nuestras ideas y nos motivaron a innovar en nuevas áreas de la ciencia. Agradecemos de manera especial el trato fraternal, la paciencia, enseñanza y el tiempo que invirtieron en la realización de nuestro trabajo, ya que cada momento significó un paso que nos acercó a nuestro objetivo, y que nos entregó nuevas herramientas para ser mejores profesionales.

Agradecemos al equipo de trabajo del Centro de Investigaciones Biomédicas, por su constante apoyo y colaboración.

Finalmente agradecemos al Dr. Marcelo Rodríguez, jefe de la Unidad de Perinatología de Hospital Carlos Van Buren y al equipo de trabajo de la Maternidad de dicho Hospital por su colaboración en la obtención de muestras.

A las madres que de manera desinteresada donaron los tejidos placentarios utilizados en esta tesis y que sin duda han contribuido en el avance de la ciencia en nuestra región.

Financiamiento.

Los costos para el desarrollo de este trabajo fueron cubiertos por los Proyectos DIPUV CI 05/2006; Anillo-Conicyt (ACT-73) y por el proyecto PBCT-Anillo ACT 07-2006. Estos Proyectos permitieron cubrir los costos relacionados con la obtención, extracción y cultivo de células amnióticas. Además incluyó la compra de los reactivos necesarios para realizar los estudios de distribución de proteínas para identificar las células obtenidas por inmunohistoquímica.

Abreviaturas.

ACCS	Solución de citoquinas de células derivadas del amnios.
AE	Epitelio amniótico.
AEC	Células del epitelio amniótico.
AMP	Células progenitoras multipotentes derivadas del amnios.
CNP	Nucleótidos cíclicos de fosfodiesterasa.
COX-2	Ciclo-oxigenasa -2, enzima clave en la generación de prostaglandinas pro-inflamatorias.
DCML	Células madre limbales.
GATA-4	Factor de transcripción codificado en humanos por el gen gata4.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida.
hACS	Células madre amnióticas humanas.
hAEC	Células del epitelio amniótico humano.
hAMSC	Células madre mesenquimáticas del amnios humano.
hCSC	Células madre coriónicas humanas.
LIF	Factor inhibitorio de leucemia.
MA	Mesénquima amniótico.
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2.
MLC-2	Cadena ligera de la miosina fosforilada 2.
MLC-2^a	Cadena de miosina 2a.
MLC-2V	Cadena de miosina 2V.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
NKx2	Gen que participa en la morfogénesis del sistema nervioso central, este gen se encuentra en el cromosoma 20.
PAX-6	Genes pareados 6 (aniridia, keratitis).
PDX-1	Homeosecuencia pancreática y duodenal 1.
RT-PCR	Transcripción Reversa y Reacción de la Cadena de Polimerasa.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Capítulo 1	
1. Desarrollo embrionario.	
1.1 Fecundación.....	5
1.2 Segmentación.....	5
1.3 Gastrulación.....	10
2. Desarrollo, estructura de la placenta y anexos embrionarios.....	12
3. Desarrollo de la membrana amniótica.....	15
3.1 Estructura básica de la membrana amniótica.....	17
4. Medicina Regenerativa y células madre.....	21
4.1 Células madre y membrana amniótica en medicina regenerativa...	27
5. Células madre derivadas del amnios.....	28
5.1 Diferenciación de células madre del amnios.....	28
6. Investigaciones de la membrana amniótica.....	31
Capitulo 2	
1. Delimitación del problema, Tipos de estudio y Objetivos	
1.1. Delimitación del problema.....	37
1.2. Tipo de estudio.....	37
1.3. Objetivo General.....	37
1.4. Objetivo específico.....	37
1.5. Criterios de inclusión.....	38
1.6. Criterios de exclusión.....	38
1.7. Variables clínicas.....	39
2. Material y método	
2.1. Obtención de membrana amniótica humana.....	40
2.2. Procesamiento de tejidos.....	40

3. Métodos.	
3.1. Protocolo N°1	42
3.2. Protocolo N°2.....	46
3.3. Protocolo N°3.....	50
3.4. Protocolo N°4.....	54
3.5. Resumen de diferencias entre protocolos.	58
3.6. Caracterización histológica.....	60
3.7. Protocolos inmunohistoquímicos.....	61
Capítulo 3	
1. Resultados.....	65
Capítulo 4	
1. Discusión.....	84
2. Conclusiones y sugerencias.....	90
Bibliografía.....	92
ANEXOS	
Anexo A: Protocolo de fijación de Methacarn para corte histológico de amnios humano.....	97
Anexo B: Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina	98
Anexo C: Protocolos de Inmunohistoquímica en cortes histológicos (Vimentina, Citoqueratina-5 y Control negativo).....	99
Anexo D: Protocolos para preparación de soluciones.....	105
Anexo E: Extracto Código Sanitario.....	107
Anexo F: Extracto de Reglamento sobre manejo de residuos de establecimientos de atención de salud (REAS).....	109

Resumen

El amnios es una membrana delgada, avascular derivada del epiblasto del embrión, se compone de una capa epitelial y una capa externa de tejido conectivo. Las células de este tejido son una buena opción para la medicina regenerativa, tanto por su plasticidad fenotípica, como por su capacidad inmuno – moduladora. Se puede disponer fácilmente de ellas, adquirir sin procedimientos invasivos y su uso no provoca debate ético. Sin embargo, debido a la complejidad de este tejido tiene que ser bien definida la zona de la cual se extraiga y los métodos para aislar este tipo de células. El objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo para el aislamiento y cultivo de amnios humano y caracterizar la viabilidad y morfología de la población de células obtenidas del amnios. Las células epiteliales amnióticas humanas (hAECs) son aisladas de las placentas de término que normalmente se desechan después del parto. Es muy importante masajear suavemente la membrana amniótica para eliminar los coágulos de sangre después de ser separada de la capa de corión subyacente de la base de la placenta. La membrana es trasladada en medio de transporte para ser seccionada y luego digerida con tripsina-EDTA. La digestión se realiza dos veces durante 60 minutos. Después de la digestión, los restos de membrana se retiran y el sobrenadante se centrifuga para obtener un pellet de células que finalmente se resuspenden y se cultivan bajo condiciones normales de la célula eucarionte. Las células aisladas se adhieren fácilmente a la placa de cultivo. El cultivo se efectúa en un medio de cultivo específico, donde las células proliferan con firmeza y muestran morfología típica; cuboideas, estrellada y alargada, por otro lado, las células obtenidas fueron sometidas a inmunohistoquímica, lo cual confirmó que correspondían a células epiteliales de la membrana amniótica. La puesta en marcha de nuevos protocolos para el aislamiento de células amnióticas puede contribuir al campo de las células derivadas del amnios teniendo en cuenta su potencial en la regeneración de los tejidos.

Abstract

The amnion is a thin, avascular membrane derived from embryo's epiblast. It is composed of an epithelial's layer and an outer layer of connective tissue. Cells from this tissue are a good choice for regenerative medicine because of their phenotypic plasticity and immunomodulatory capability. They are readily available and easily procured without invasive procedures, and its use does not elicit ethical debate. However, because of the complexity of this tissue the region needs to be well defined and also the region of origin and methods of isolation of cells derived from the human amnion. The aim of this work is to develop new protocols for human amnion isolation and morphologically characterize the derived cell population.

Human amniotic epithelial cells (hAECs) are isolated from term placentas which would normally be discarded after delivery. It is very important to gently massage the amniotic membrane to remove blood clots after being peeled from the underlying chorion layer of the placenta body. The membrane is transferred in transport medium to be sectioned and then digested with trypsin-EDTA solution.

Digestion is performed twice for 60 minutes each. After digestion is completed, membrane leftovers are withdrawn and the supernatant is centrifuged to obtain a cell pellet which is finally resuspended in a fresh medium which are grown under normal eukaryotic cell conditions. Isolated cells readily adhere to the cultivation plate. The cultivation takes place in a specific culture medium, where cells proliferate strongly and show typical morphology, cuboid, elongated star, on the other hand, the cells obtained were subjected to immunohistochemistry, which confirmed that they corresponded to epithelial cells amniotic membrane. The implementation of new protocols for the isolation of amniotic cells may contribute to the field of amnion-derived cells in view of their potential in tissue regeneration.

Introducción

La obtención de células madre, su cultivo y posterior diferenciación representan un importante avance en el tratamiento de enfermedades por medio de la terapia celular, que ha avanzado de manera considerable en las últimas décadas.

Actualmente en Chile existen 4 centros privados de células madre, Vidacel, Cryocell, Cordón Vital y Blood Bank Chile, en los cuales la sangre conservada del cordón umbilical pertenece a quien la donó y sólo dicha persona puede utilizarla (CordbloodbankChile ; CordonVital ; CryoCell ; Vidacel). También existe un banco público de células madre, llamado “Banco de Vida”, en el que las personas que tienen sus hijos en el Hospital Clínico de la Universidad Católica, en la Clínica San Carlos de Apoquindo y en la Clínica Santa María, pueden donar en forma voluntaria sus células madre de sangre de cordón umbilical. Éstas células se criopreservan y son destinadas para la utilidad pública, donde podrán ser utilizadas por cualquier individuo compatible con las células que requiera un trasplante sanguíneo o alguna terapia. El banco asume los costos que implica todo el procedimiento. (Banco de Vida)

La finalidad del presente estudio es estandarizar y llevar a cabo un protocolo para la obtención de células epiteliales provenientes de la membrana amniótica humana, para su posterior uso en medicina regenerativa.

A diferencia del trabajo que se realiza en los centros mencionados, esta investigación propone la extracción de células madre a partir de la membrana amniótica, la cual es una nueva fuente de células madre que se está investigando.

Diversos Centros de Investigación y Desarrollo a nivel mundial han realizado múltiples avances en cuanto a estas materias y están un paso al frente en cuanto al tratamiento de enfermedades degenerativas. Recientemente se ha trabajado con células madre de tejido amniótico proveniente de placentas obtenidas posterior al parto, por lo tanto la controversia ética provocada por la obtención de

células madre a partir de embriones humanos queda revocada. Esto tiene gran relevancia, ya que en Chile existe una cultura de eliminación de placentas que son consideradas un desecho biológico, desconociéndose las propiedades que este tejido puede aportar a la medicina posterior al alumbramiento.

La placenta humana es un órgano fundamental para el desarrollo de la gestación, por esta razón, el profesional matrn y matrona debe conocer a fondo no sólo las funciones de la placenta durante la gestación, sino también sus características morfológicas y propiedades en otros ámbitos. Este estudio permite aprovechar al máximo el tejido amniótico, dadas sus propiedades antiinflamatorias y de supresión de la respuesta inmune, lo cual facilita el trasplante exógeno y la estimulación endógena de células madre para generar sus titutos biológicos y mejorar funciones del tejido al cual es trasplantado (Ilancheran S. 2009)

Esta tesis es el primer paso para seguir adelante con estudios referidos a células madre amnióticas humanas, de manera que esta investigación continúe desarrollándose hasta lograr, entre otros objetivos, la generación de un banco público de células madre en la región y la utilización del amnios en el ámbito terapéutico.

Capítulo 1

1. Desarrollo embrionario.

El periodo embrionario se inicia con la fecundación y termina 8 semanas después (Pérez A 2005).

Existen tres procesos que caracterizan las etapas iniciales del desarrollo embrionario:

- ❖ Fecundación.
- ❖ Segmentación.
- ❖ Gastrulación.

1.1. Fecundación:

La fecundación trae consigo muchos procesos, los cuales se inician cuando los espermatozoides penetran la corona radiada que rodea el óvulo y termina con el apareamiento de los cromosomas maternos y paternos tras la entrada del espermatozoide en el óvulo (Carlson B. 2005)

Los principales resultados de la fecundación son, restablecer el número diploide de cromosomas, determinación del sexo genético del individuo y por último, iniciación de la segmentación (Langman T.W. 2004).

1.2. Segmentación:

La segmentación del embrión ocurre en las trompas de Falopio. Este fenómeno consiste en una serie de divisiones celulares asincrónicas, muy rápidas que experimenta el cigoto. La primera división origina dos células de distinto tamaño, llamadas blastómeras, posteriormente se divide la blastómera más grande y luego la más pequeña, y así sucesivamente. No hay crecimiento celular entre una mitosis y la siguiente, por lo tanto las células son cada vez más pequeñas. Cada

blastómera es indiferenciada y totipotente, es decir, tienen la capacidad de generar cada una de ellas a un individuo completo (Langman T.W. 2004).

A medida que ocurre la segmentación, el embrión se moviliza en el interior de las trompas en dirección a la cavidad uterina, envuelto por la zona pelúcida y la corona radiada, esta última la pierde dos días después de empezar la segmentación, mientras que la zona pelúcida se mantiene hasta llegar a la cavidad uterina.

Las blastómeras pierden su totipotencialidad en el momento de la compactación, donde sufren su primera diferenciación. Después de completar dieciséis células, se constituye una mórula y se inicia el proceso llamado compactación, en cuyo desarrollo las blastómeras más externas se adhieren íntimamente entre sí mediante uniones nexos y uniones estrechas, perdiendo su identidad individual. Este proceso, que tiene lugar a unos cuatro días posterior a la fecundación se llama cavitación. La unión de las células externas dará origen al trofoblasto, la población interna dará origen al embrioblasto o macizo celular interno (Carlson B. 2005). El trofoblasto es un tejido especializado que origina la conexión trófica entre el embrión y la madre.

Ya al séptimo día post-fecundación, el trofoblasto digiere la zona pelúcida y se inicia el proceso de implantación, por el cual el blastocisto toma contacto con el endometrio y se une a él. Este proceso está regulado por la expresión en el útero del denominado "Factor inhibitorio de leucemia" (LIF) el cual promueve la adherencia del embrión al epitelio uterino, así como la decidualización del útero (Carlson B. 2005).

Las células del embrioblasto son pluripotentes, es decir, son capaces de generar todos los tejidos del embrión (Langman T.W. 2004).

Entre el quinto a sexto día, a partir de la fecundación, el blastocisto se adhiere a la mucosa uterina, siendo el lugar normal de contacto la parte superior de la pared

posterior del cuerpo del útero. Las células del trofoblasto ubicadas junto al embrioblasto se diferencian en dos capas, una de ellas se denomina citotrofoblasto y la otra sinciotrofoblasto, esto está modulado por factores intrínsecos y de la matriz extracelular del estroma endometrial en secuencias programadas (Moore T. 2004).

El sinciotrofoblasto, secreta gonadotrofina coriónica humana, hormona que mantiene el cuerpo lúteo funcional durante el desarrollo embrionario y el primer trimestre del embarazo. Las células del sinciotrofoblasto desplazan a las células endometriales en el lugar de la implantación. Estas células sufren procesos de apoptosis, facilitando la invasión de endometrio materno. En este proceso participan las enzimas proteolíticas producidas por el sinciotrofoblasto, así como prostaciclina derivada de las COX-2 y ligando Fas, presentes en el sitio de implantación (Carlson B. 2005). Algunas de las células deciduales adyacentes al sinciotrofoblasto degeneran y suponen una rica fuente de nutrientes para el embrión. Mientras esto ocurre en la región del embrioblasto que mira hacia la cavidad del blastocisto, comienzan a diferenciarse las células del hipoblasto (endodermo primario), que constituirán la hoja inferior del embrión (Carlson B. 2005).

En la parte superior del embrioblasto y en el límite entre estas células con las células trofoblásticas, aparece un segundo tejido, el epiblasto, el cual generará un espacio que corresponde al inicio de la formación de la cavidad amniótica. De esta manera, se forma el embrión bilaminar, constituido por una hoja superior llamada epiblasto y una hoja inferior llamada hipoblasto. El epiblasto, la capa más gruesa está formado por células cilíndricas altas, que forman la cavidad amniótica y los amnioblastos. El hipoblasto, constituido por células cúbicas pequeñas, que constituye la hoja inferior del embrión, formará el saco vitelino (Langman T.W. 2004).

A medida que avanza el proceso de implantación continúan desarrollándose el citotrofoblasto y el sinciotrofoblasto. Aparece una nueva población celular que constituye el mesoderma extraembrionario que ocupa el espacio comprendido entre el citotrofoblasto, el amnios y el saco vitelino primitivo en formación. Posteriormente en el mesoderma extraembrionario, se forman grandes cavidades, las cuales confluyen y originan un nuevo espacio que se denomina cavidad coriónica. Esta cavidad rodea al saco vitelino primitivo y a la cavidad amniótica.

El mesoderma extraembrionario que reviste al citotrofoblasto y al amnios se denomina somatopleura extraembrionaria, y el que cubre el saco vitelino recibe el nombre de esplacnopleura extraembrionaria. Al final de la segunda semana el hipoblasto produce células que migran hacia el saco vitelino primitivo, estas células proliferan y forman la pared de una nueva cavidad y reciben el nombre de saco vitelino secundario o definitivo y reemplaza al saco vitelino primitivo. (Langman T.W. 2004).

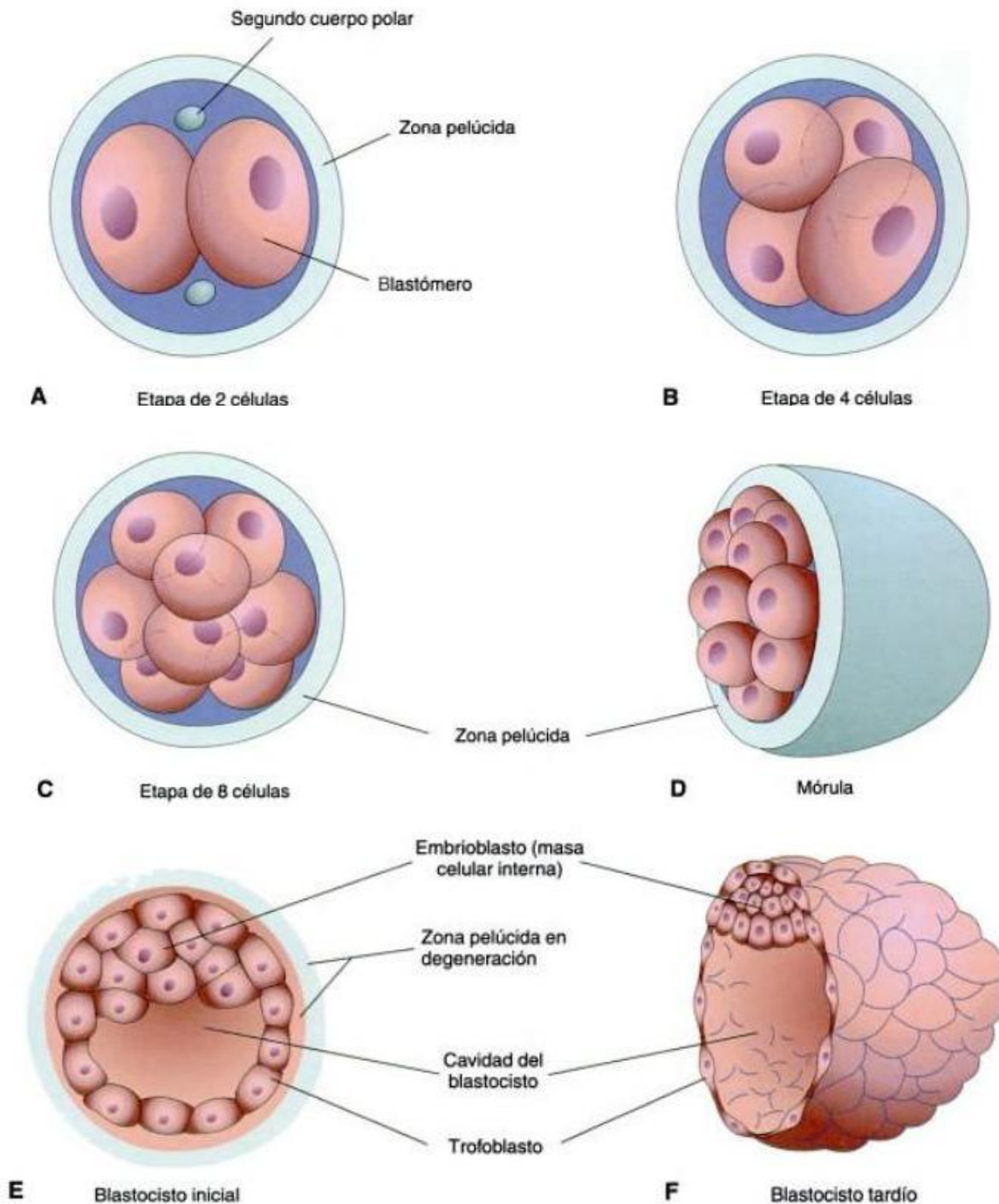


Figura 1: Dibujos que ilustran la segmentación del cigoto y la formación del blastocisto. **A, B, C, D** muestran diversas etapas de la segmentación. El periodo de mórula comienza en la etapa de 12 a 16 células y termina cuando se forma el blastocito. **E, F** son cortes de blastocitos, la zona pelúcida ha desaparecido hacia finales de la etapa del blastocito (5 días).(Moore T. 2004).

1.3. Gastrulación:

En esta etapa el embrión bilaminar adquiere, mediante un proceso conocido como gastrulación, una tercera hoja embrionaria, llamada mesodermo, que se ubica entre las hojas embrionarias ectodermo y endodermo. La gastrulación constituye el origen de la morfogénesis, desarrollo de la forma del cuerpo. La gastrulación, se inicia con la formación de la línea primitiva, que aparece como un engrosamiento en el extremo caudal del epiblasto, debido a la proliferación y migración de las células del epiblasto hacia el plano medio del disco embrionario. A medida que la línea se alarga por la adición de células a su extremo caudal, su extremo craneal prolifera para formar el nódulo primitivo, simultáneamente, en la línea primitiva se desarrolla un surco estrecho, el surco primitivo que continúa con una pequeña depresión en el nódulo primitivo, la fóvea o fosita primitiva. Con la formación de la línea primitiva se puede identificar el eje craneo caudal del embrión (Moore T. 2004). Cuando esto sucede, las células del epiblasto pierden su característica de epitelio (superficie apical u basal bien definida) y adquieren forma y características mesenquimáticas, que es un tejido laxo suspendido en una matriz gelatinosa, las células mesenquimáticas tienen forma ameboidea y actividad fagocítica (Moore T. 2004).

Algunas de las células del epiblasto desplazan al hipoblasto, formando el endodermo intraembrionario, las células restantes del epiblasto dan origen al ectodermo embrionario. Cuando ha finalizado la gastrulación, el embrión está formado por tres hojas embrionarias, una hoja superior, llamada ectodermo, una hoja media, llamada mesodermo y una hoja inferior, llamada endodermo (Pérez A 2005).

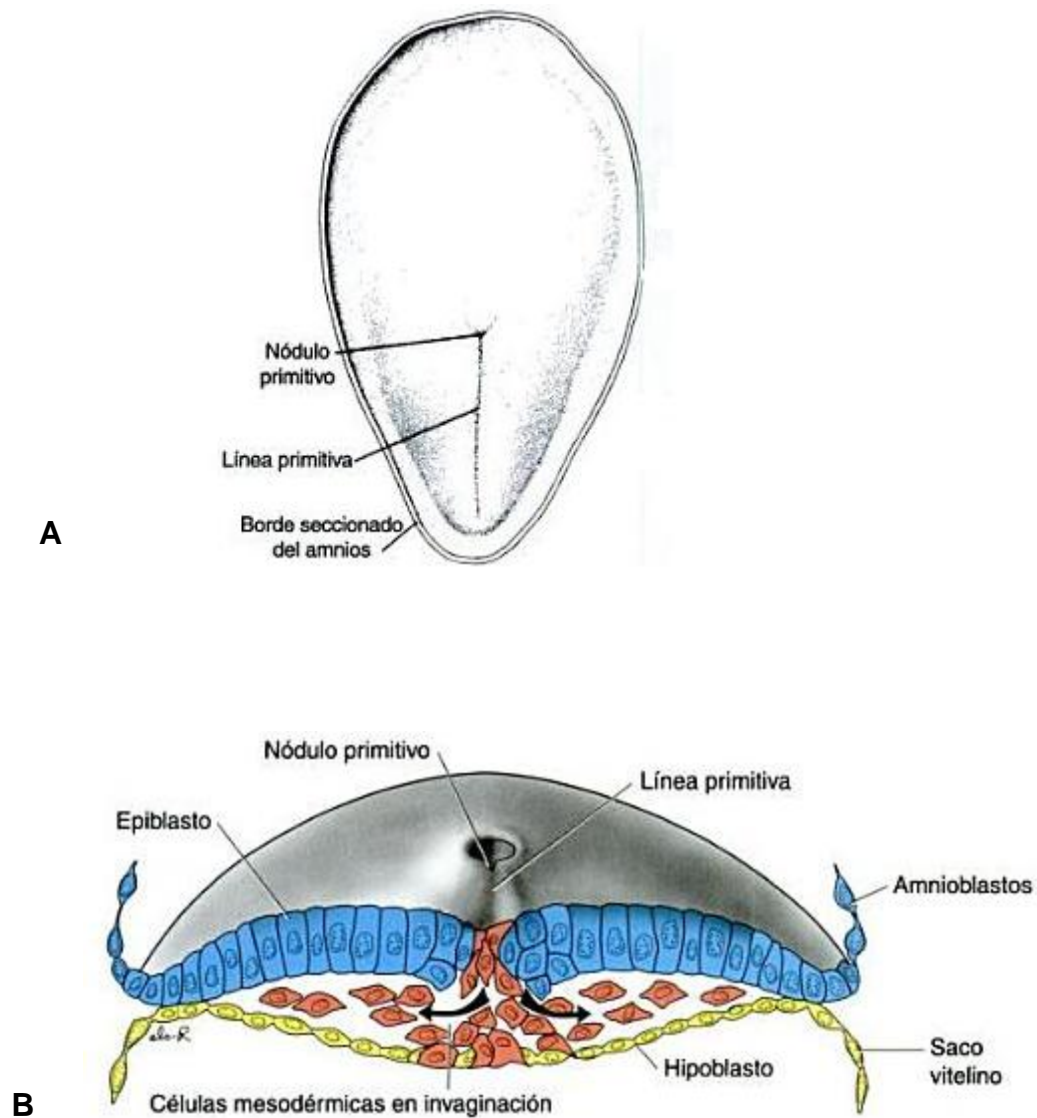


Figura 2: **A.** Vista dorsal de un embrión de 18 días. En su extremo caudal se advierten la línea primitiva y el nódulo primitivo. **B.** Corte transversal a nivel de la región craneal de la línea primitiva a los 15 días que muestra la invaginación de las células epiblasticas. Las primeras células que se movilizan hacia adentro desplazan al hipoblasto para crear al endodermo definitivo. Una vez establecido éste, el epiblasto que se moviliza hacia adentro forma el mesodermo (Langman T.W. 2004).

2. Desarrollo, estructura de la placenta y anexos embrionarios.

La placenta es un órgano fundamental durante el desarrollo de la gestación, debido a que cumple diversas funciones que permiten la mantención del embarazo y el desarrollo normal del feto. Es por esto que, permite que la circulación fetal y la circulación materna mantengan una relación estrecha, logrando el intercambio gaseoso y nutritivo. Asimismo cumple una función endocrina y metabólica. Por lo que su desarrollo es desde el inicio de la gestación hasta el término de esta y llega a conformar una estructura compleja.

En la primera semana de desarrollo, se permite diferenciar 2 tipos de células, las que conforman el macizo celular interno, llamado embrioblasto y las células externas que pasan a conformar el trofoblasto. (Langman T.W. 2004)

En el ser humano, las células trofoblásticas comienzan a introducirse entre las células epiteliales de la mucosa uterina alrededor del sexto día. En este proceso intervienen diversas sustancias tales como las integrinas, lamininas y fibronectinas que ayudan a la adhesión e invasión del trofoblasto. Este proceso da el inicio para la conformación de la placenta, desarrollo que está conformado por dos etapas la pre – vellosa y la vellosa.(Langman T.W. 2004)

La etapa pre – vellosa, entre los días 6 - 13 y la etapa vellosa, a partir del día 13. La etapa pre – vellosa incluye dos períodos: el período prelacunar y el período lacunar (Mihu, Susman et al. 2009). El periodo prelacunar se refiere a la implantación del embrión y a la diferenciación del trofoblasto en dos capas, el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto.

La etapa subsiguiente es la etapa lacunar en la cual se conforman las vellosidades iniciales, llamadas vellosidades primarias. (Langman T.W. 2004)

Luego de ocurrido esto, ocurre la etapa vellositaria, en la cual el trofoblasto queda constituido por abundantes vellosidades, las cuales tienen la característica de ser secundarias y terciarias.

Por lo tanto, el trofoblasto queda finalmente correlacionado al mesodermo de la lámina coriónica y se unen periféricamente a la decidua materna por medio de la envoltura citotrofoblástica externa. Estas vellosidades están formadas por el sincitiotrofoblasto, que a su vez, cubren la parte central del mesodermo vascularizado (Langman T.W. 2004). Luego estas vellosidades conformarán un sistema capilar que permitirá relacionar los capilares de la lámina coriónica con los del pedículo de fijación, lo cual da origen finalmente al sistema vascular extraembrionario.

En los meses siguientes, las vellosidades del polo embrionario siguen creciendo, lo cual dará origen al corión frondoso. Las vellosidades que se encuentran en el polo anembrionario reciben el nombre de corión liso o leve (Langman T.W. 2004).

El amnios durante el tercer mes, ha expandido su tamaño, por lo que se pone en contacto con el corion y la cavidad coriónica se oblitera.

Hacia el comienzo del cuarto mes, la placenta posee dos componentes, una porción fetal formada por el corion frondoso y donde la placenta está rodeada por la lámina coriónica y una porción materna, constituida por la decidua basal, cuya lámina decidual es la porción más incorporada a la placenta (Langman T.W. 2004).

Entre las láminas coriónica y decidual se encuentran los espacios intervillosos ocupados por la sangre materna.

Igualmente la decidua basal forma varios tabiques deciduales, que pueden llegar a ocupar los espacios intervillosos, pero que no llegan a atravesar la lámina coriónica. Estos tabiques están cubiertos por una capa de células sincitiales, de manera que en todo momento hay una capa sincitial que separa a la sangre materna. (Langman T.W. 2004)

Finalmente la placenta queda dividida en varios compartimientos, debido a la formación de los tabiques deciduales. Estos compartimientos reciben el nombre de cotiledones, los cuales conforman una cantidad de 15 – 20 en nuestra especie.

Al observar una placenta de término, podemos darnos cuenta que está conformada por 2 caras; por una parte el lado materno, conformado por los cotiledones y por otra el lado fetal que está cubierta por la lamina coriónica.

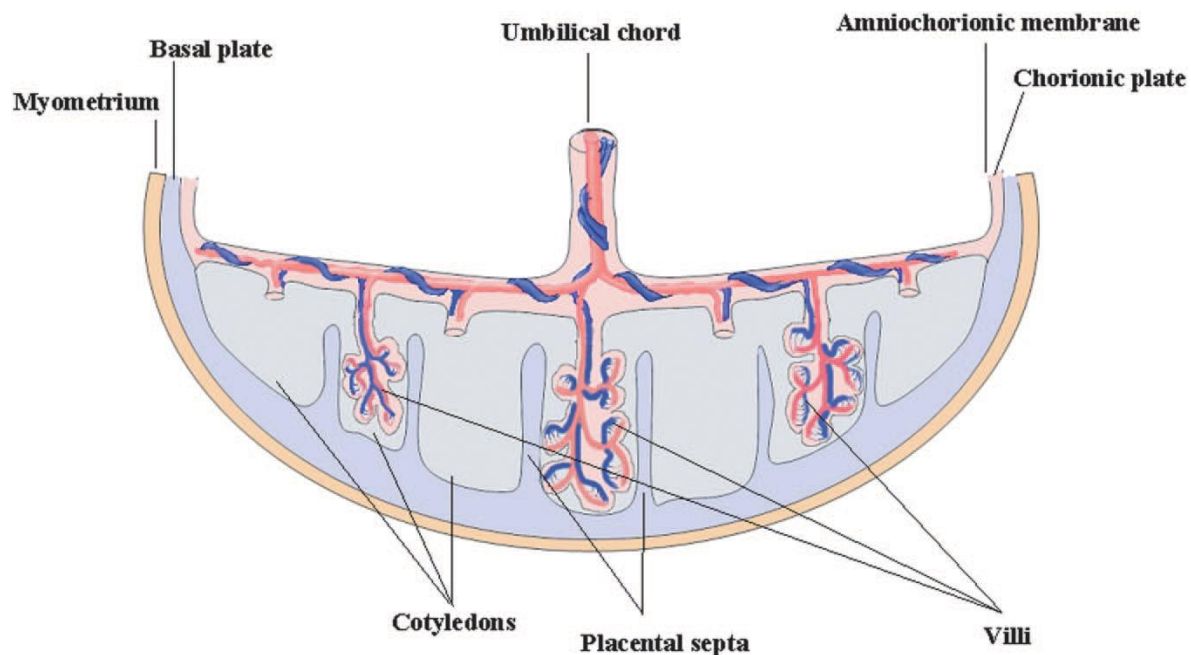


Figura 3. Sección esquemática de una placenta humana de término. Durante la formación de la placenta, la decidua basal, en los espacio intervillosos forma tabiques deciduales que dividen el parénquima en los cotiledones. Cada cotiledón contiene varias vellosidades, que se originan de la placa coriónica. Los vasos sanguíneos fetales se encuentran dentro de las ramas de las vellosidades. (Parolini, Alviano et al. 2008)

3. Desarrollo de la membrana amniótica.

Cerca del 8^{vo} día post-fecundación, el blastocisto humano se adhiere parcialmente en el estroma del endometrio. Las células externas (trofoblasto) del blastocisto se diferencian en dos capas y migran hacia el estroma. La masa celular interna, como fue mencionado anteriormente, se diferencia en dos capas, el epiblasto y el hipoblasto. El epiblasto es la fuente de las tres capas germinales y, finalmente, forma el embrión en desarrollo.

Al mismo tiempo, una pequeña cavidad (cavidad amniótica) aparece en el epiblasto, las células del epiblasto adyacente al citotrofoblasto se llaman amnioblastos. El amnioblasto que se encuentra bordeando la cavidad amniótica se diferencia en el epitelio amniótico y se amplía la cavidad. Al mismo tiempo, una capa de mesénquima extraembrionario alrededor de la capa de células del epitelio amniótico, se desarrolla en el tejido conectivo amniótico (Miki and Strom 2006).

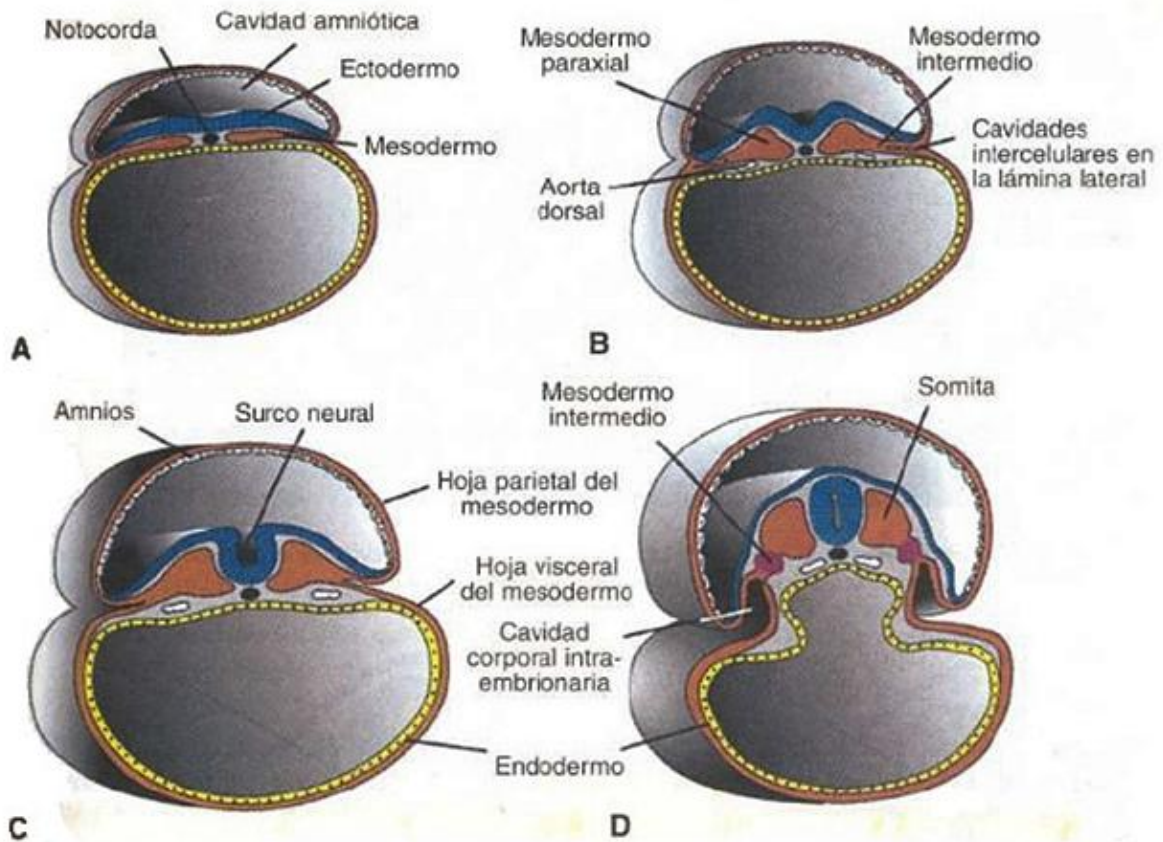


Figura 4: Esquemas de corte transversal del embrión en los que se puede apreciar el desarrollo de la hoja germinativa mesodérmica. **A.** Día diecisiete. **B.** Día diecinueve. **C.** Día veinte. **D.** Día veintiuno. La delgada hoja mesodérmica da origen al mesodermo paraxial (los futuros somitas), el mesodermo intermedio (las futuras unidades excretoras) y la lámina lateral, que se separa en las hojas del mesodermo parietal y visceral que revisten la cavidad celómica intraembriónica (Langman T.W. 2004).

Al término de la gestación, la superficie fetal de la placenta está cubierta en su totalidad por el amnios, que tiene una superficie de aproximadamente 700-1200 cm² y un espesor de 0,02 a 0,5 cm (Bourne G. 1962). Esta membrana, no contiene vasos sanguíneos o nervios, sino que los nutrientes que requiere son suministrados directamente por la difusión a través del líquido amniótico y / o de la decidua (Niknejad, Peirovi et al. 2008).

3.1. Estructura básica de la membrana amniótica.

Las membranas fetales del ser humano están formadas por el amnios y el corion. El amnios es la más interna de las dos membranas fetales, la cual se encuentra en contacto con el líquido amniótico, el feto y el cordón umbilical. La membrana coriónica, que se adjunta a la superficie externa de la membrana amniótica, se separa de la decidua y del útero materno (Bourne G. 1962).

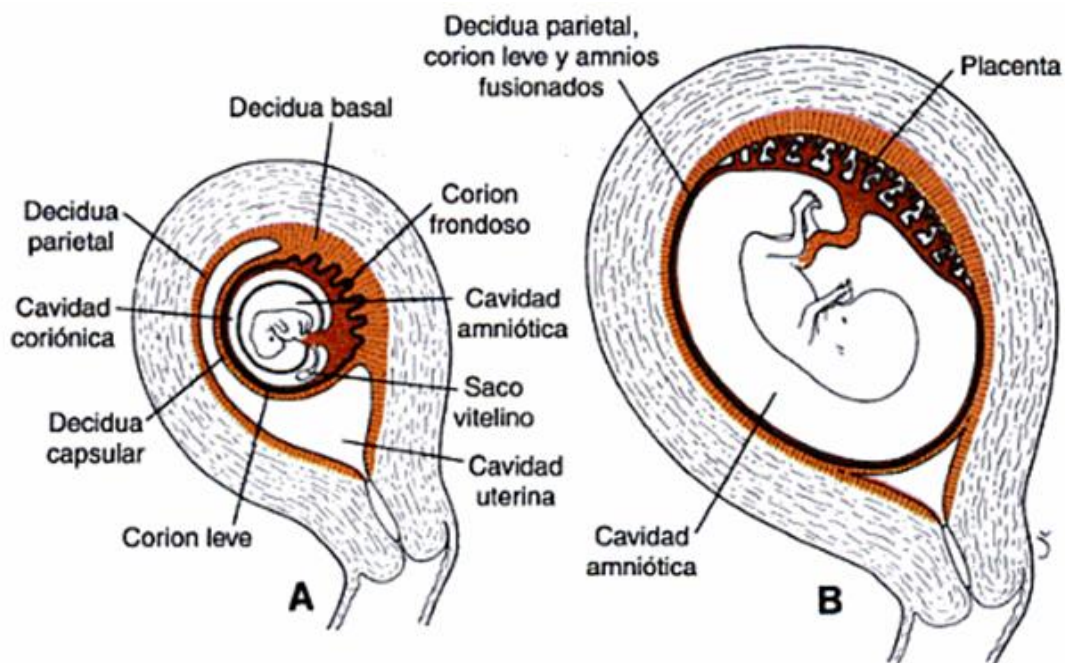


Figura 5: Relación de las membranas fetales con la pared del útero. **A.** Al final del segundo mes. Se observa el saco vitelino en la cavidad coriónica entre el amnios y el corion. En el polo abembrionario las vellosidades han desaparecido (corion leve). **B.** Final del tercer mes. El amnios y el corion se han fusionado y la cavidad uterina queda obliterada por la fusión del corion leve con la decidua parietal. (Langman T.W. 2004)

Las membranas ovulares (corion y amnios) delimitan la cavidad amniótica, encontrándose en íntimo contacto a partir de las 15-16 semanas del desarrollo embrionario, obliterando la cavidad coriónica o celoma extraembrionario (Moore T. 2004).

A los 31-35 días de gestación, la membrana amniótica es un tejido de origen fetal que se compone de tres capas principales, que corresponden al epitelio, una membrana basal y un mesénquima avascular compuesto por una capa compacta, una capa de fibroblastos y una capa intermedia (esponjosa) que se ubica entre el amnios y corion (Miki and Strom 2006).

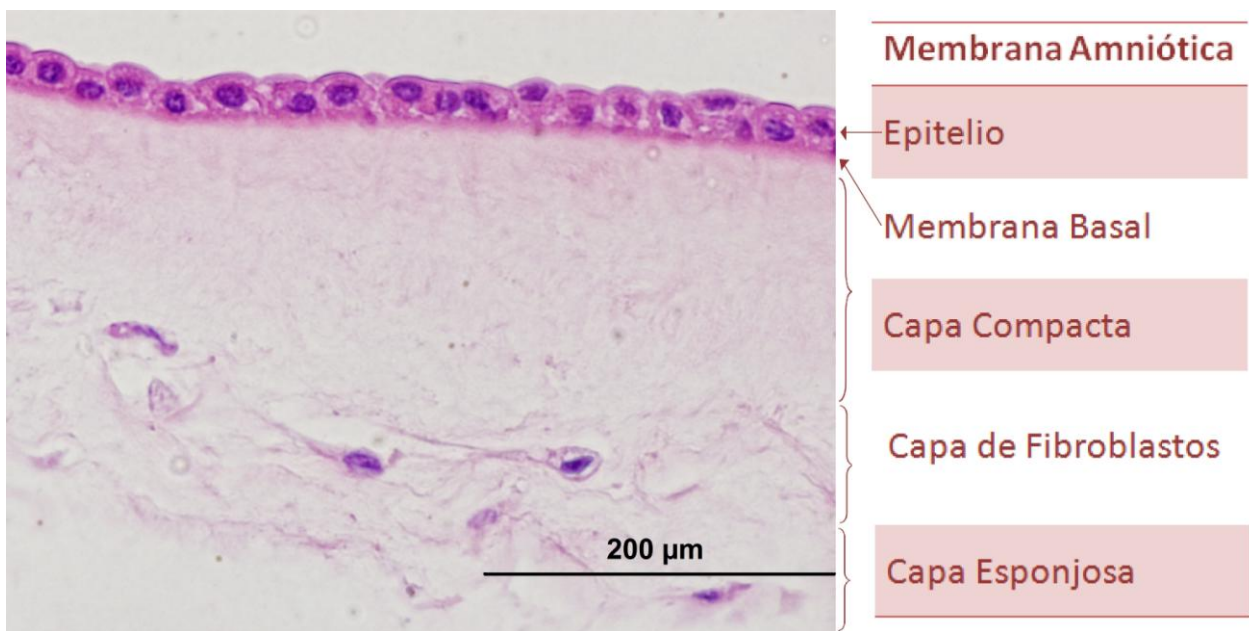


Figura 6: Tinción hematoxilina- eosina de la membrana amniótica humana.(CIB)Aumento 40X.

Epitelio Amniótico.- Es la capa más interna y está en contacto con el líquido amniótico, este consta de una sola capa de células que contienen un extenso sistema de canales que se comunican directamente con el espacio extracelular. Normalmente son cúbicas, pero también pueden ser columnares sobre la placenta o aplanadas en zonas aisladas del resto del amnios. El vértice o cara interna de las células es ligeramente convexo mientras que en la superficie, se forman microvellosidades. Las células epiteliales normalmente contienen un solo núcleo que es de contorno irregular y fenestrado.

El citoplasma es denso y granular, además contiene múltiples vacuolas que varían en tamaño y contenido. Las mitocondrias son escasas y pequeñas (Rivera Z 2004).

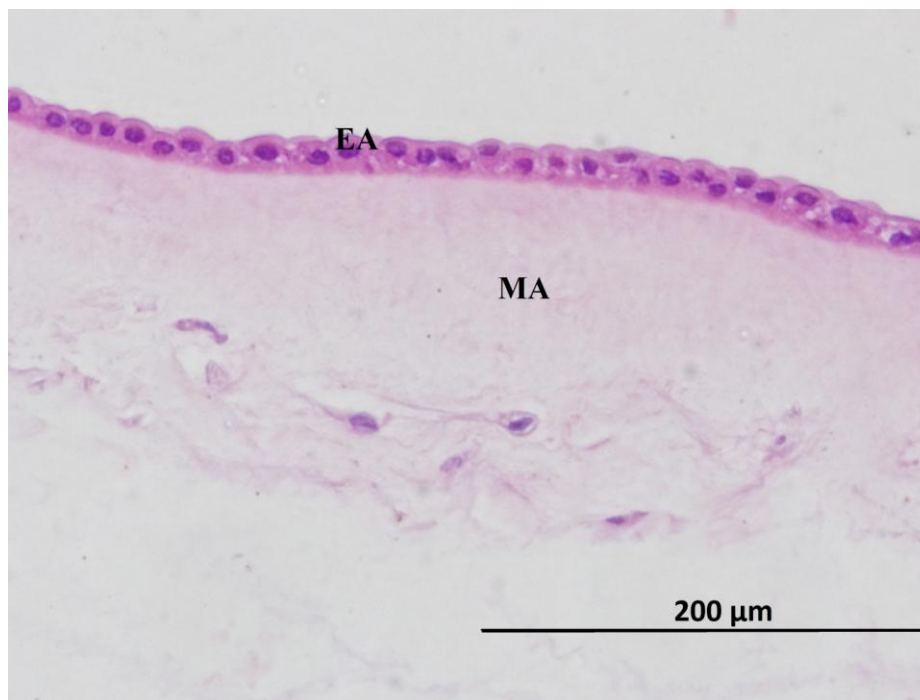


Figura 7: Tinción hematoxilina- eosina de la membrana amniótica humana. EA epitelio amniótico, MA mesénquima amniótico.(CIB)Aumento 40X.

Membrana basal.- Se trata de una fina capa compuesta de una red de fibras de colágenos tipo III, IV, V, laminina, nidógeno y fibronectina.

Capa compacta.- La cual se encuentra compuesta por una compleja red de fibras de colágeno tipo I, III, V y VI lo que le confiere su integridad mecánica.

La capa de fibroblastos.- Corresponde a la primera capa del mesénquima amniótico y es la capa más gruesa del amnios, se compone de una red de fibroblastos, macrófagos y una matriz de tejido conectivo laxo.

La capa esponjosa.- Permite que el amnios se deslice sobre el corion subyacente, que está firmemente adherido a la decidua materna. Esta presenta abundante contenido de proteoglicanos y glicoproteínas, además de colágeno tipo III (Rivera Z 2004).

4. Medicina Regenerativa y células madre.

Es conocido que diversos tejidos y órganos humanos son capaces de auto repararse o incluso de regenerarse. En efecto, hasta muy recientemente se habían clasificado los tejidos en aquellos que no tienen capacidad de regenerarse por sí mismos, como el tejido nervioso, los que poseen escasa capacidad regeneradora, como el óseo, los que no tienen capacidad de regenerarse, pero están dotados de una cierta capacidad de auto reparación, como el músculo esquelético, y otros como, por ejemplo, la piel que puede regenerarse completamente. Imitando esta capacidad biológica auto reparadora de los tejidos humanos, se ha desarrollado el concepto de medicina regenerativa, la cual busca reparar los tejidos u órganos que fallan, de manera que recuperen su función (Aznar. J 2008). Para lograr esto, es preciso practicar microtrasplantes de células que, de un modo similar al trasplante de un órgano entero (hígado, corazón, riñón, u otro) podrían suplantar la función de las células alteradas y seguir reproduciéndose de manera normal. Ampliando el concepto de medicina regenerativa se llega a la medicina reparadora, la cual, además de utilizar todas las modernas tecnologías de trasplantes por donación de órganos, propone reparar los tejidos dañados utilizando mecanismos similares a los que de forma natural usa el organismo humano para este fin (Aznar. J 2008).

La medicina regenerativa se basa, en gran medida, en la utilización de células madre. Una célula madre posee la capacidad de replicarse y diferenciarse dando lugar a diversos tipos de células especializadas (Rodríguez-Pardo 2011). Las propiedades que definen a una célula madre son las siguientes:

1. No está totalmente diferenciada (es decir, no se encuentra al final del proceso de diferenciación).
2. Se puede dividir sin límites, por lo menos durante el ciclo vital del organismo.

3. Cuando se divide, cada célula hija puede permanecer como célula madre, o puede iniciar una vía que conduce irreversiblemente hacia la diferenciación terminal (Albert B 2004).

Como células madre, no han alcanzado el estadio de diferenciación terminal y son capaces de autorregenerarse indefinidamente, dando lugar a los diferentes tipos celulares especializados que componen un organismo. Las células madre presentan la suficiente "flexibilidad" para generar células especializadas de otros linajes diferentes a los determinados por su propio origen y localización. A partir de ese conocimiento cabe pensar en dirigir estos procesos para originar cultivos celulares, o cultivos de tejidos in vitro, que pudieran sustituir in situ a los tejidos dañados por procesos patológicos, desarrollando las correspondientes aplicaciones médicas de estas investigaciones (Nombela. C 2002)

Tradicionalmente se han denominado células madre, a células indiferenciadas con una variada capacidad de potencia, entendiendo por tal la posibilidad de desarrollar tipos de células distintas a su línea celular original. También se han definido como células con capacidad ilimitada de perpetuarse y que pueden producir al menos un tipo de células adultas (Aznar. J 2008).

Estas células generan gran interés por los diferentes modelos de diferenciación celular a los que pueden ser conducidas, desde el modelo convencional; célula madre, célula hija, hasta procesos de transdiferenciación, de-diferenciación y re-diferenciación celular; es así como estos modelos son aplicados en la actualidad para entender el fenómeno de la "plasticidad" que ha sido reconocido en este tipo de células. La plasticidad de las células madre se reconoce como la capacidad que poseen estas células para generar grupos celulares diferentes a los de su tejido de origen (Rodríguez-Pardo 2011).

Según la plasticidad de las células madre, existen tres categorías:

- **Células madre totipotentes:** El término “totipotencial” (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario) (Rodríguez-Pardo 2011). Estas células derivan de la masa celular interna de un embrión al estado de blastocisto, esto es, dependiendo de la especie, 4-7 días después de la fecundación. Esta estructura particular surge como resultado de una serie de divisiones sucesivas de las células embrionarias (o blastómeras), donde las células que se encuentran en la parte más interna se desarrollan y especializan en los tejidos de las diferentes capas germinales del embrión; endodermo, mesodermo y ectodermo, formando así todos los tejidos de un organismo (Arias. M 2009).
- **Células madre pluripotentes:** El término “pluripotente” (del latín *plures*, que significa muchos o varios) es utilizado para describir las células madre pluripotentes que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo (Rodríguez-Pardo 2011).
- **Células madre multipotentes:** Las células madre multipotentes son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias; por ejemplo, células madre que dan origen a tejidos derivados exclusivamente del endodermo como tejido pancreático o pulmonar (Rodríguez-Pardo 2011).

Las células madre participan activamente en el desarrollo embrionario pero también continúan presentes en los organismos adultos. Según el tejido de origen, se pueden clasificar en tres tipos: (Rodríguez-Pardo 2011)

- **Células madre embrionarias:** Son aquellas que constituyen la masa interna del blastocisto temprano (de 4-5 días en el caso del humano). Estas células

pueden diferenciarse en los diferentes tipos celulares procedentes de cualquiera de las tres hojas blastodérmicas: ectodermo, endodermo y mesodermo(Aznar. J 2008).

- **Células madre germinales:** Tienen potencialidades similares a las células madre embrionarias y pueden encontrarse en la cresta gonadal de los fetos humanos de 5 a 10 semanas. De ellas se derivarán las células germinales que darán origen a los gametos (Arias. M 2009).
- **Células madre somáticas o adultas:** Se encuentran en el individuo adulto durante toda su vida postnatal y son capaces de responder a estímulos regenerativos e iniciar un proceso de autorrenovación, tras el cual algunas de ellas son capaces de diferenciarse hacia linajes especializados, propios del tejido en el que se encuentran, es decir, de la misma hoja blastodérmica de la que procede el órgano que las alberga. Son células multipotentes, ya que poseen una capacidad limitada para diferenciarse, dando origen sólo a las células de un órgano concreto en el embrión y/o en el adulto. El ejemplo más clásico de estas células son las células madre de la médula ósea, las cuales pueden generar los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune; las células madre de la placenta y/o cordón umbilical, que se extraen al momento del parto, para futuros tratamientos de enfermedades, sobre todo del tipo hematológico como leucemias, anemias y linfomas (Arias. M 2009).

La mayoría de los tejidos de un individuo adulto posee una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular (células madre adultas). Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células madre mesenquimáticas y las células madre hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células madre de la piel o las células madre gonadales (células madre germinales) (Hernández P 2004).

Las células madre son necesarias siempre que se presenta la exigencia recurrente de reemplazar células diferenciadas, las cuales no pueden dividirse por sí mismas. En diversos tejidos el estado terminal de diferenciación celular es incompatible con la división celular. El núcleo celular, por ejemplo, puede destruirse, como sucede en las capas más externas de la piel, o puede ser expulsado como ocurre en los eritrocitos de los mamíferos. También es posible que el citoplasma esté sobrecargado de estructuras, como por ejemplo de miofibrillas en las fibras musculares estriadas, que dificulten la mitosis y la citocinesis. En otras células diferenciadas de forma terminal, las propiedades químicas de la diferenciación han de ser incompatibles con la división celular de algún modo más sutil. En cualquiera de estos casos, la renovación ha de depender de las células madre (Albert B 2004).

La misión de las células madre no consiste en llegar a diferenciarse, sino en producir células que se diferencien. A consecuencia de ello, las células madre tienen a menudo un aspecto poco conspicuo, por lo que resultan difíciles de identificar. Pero esto no quiere decir que todas las células madre sean iguales. No están diferenciadas de forma terminal, pero sí están determinadas: la célula satélite muscular, que origina el músculo esquelético, la célula madre epidérmica, que origina las células epidérmicas queratinizadas, las espermatogonias, que originan espermatozoides, la célula basal del epitelio olfatorio, que origina las neuronas olfatorias, entre otros (Albert B 2004).

La mayor dificultad técnica de la medicina regenerativa viene dada por la obtención de los tipos celulares deseados. La controversia sobre las células madre es el debate ético sobre las investigaciones de la creación, uso y destrucción de las células madre embrionarias. Éste es también el punto que plantea mayores dilemas y discusiones éticas, tanto en la comunidad científica como entre la población en general. La oposición a las investigaciones dice que esta práctica puede llevar a la clonación y fundamentalmente a la desvalorización de la vida humana. Contrariamente, las investigaciones médicas opinan que es necesario

proceder con las investigaciones de las células madre embrionarias porque las tecnologías resultantes podrían tener un gran potencial médico, y que el exceso embrionario creado por la fertilización in vitro puede ser donado para las investigaciones. Existe un amplio debate ético que suscita, por utilizar embriones para la obtención de las células madre necesarias para el desarrollo de nuevos tejidos (Wagner S 2008). Por ello, tratar de obtener células madre embrionarias humanas o células de carácter biológico similar a éstas, por un procedimiento técnico que no conlleve dificultades éticas, es uno de los problemas biomédicos más atractivos en la actualidad.

En relación con las células madre embrionarias, son dos las posibilidades de obtenerlas: de embriones congelados sobrantes de las técnicas de fecundación in vitro o de embriones humanos generados por transferencia nuclear somática, la denominada donación terapéutica. Desde un punto de vista ético, varias de estas soluciones presentan una importante dificultad añadida, derivada del hecho de que los embriones humanos a utilizar, sean destruidos o no, tienen que ser generados por fecundación in vitro, técnica que en sí misma conlleva objetivas dificultades morales (Aznar. J 2008).

Desde el punto de vista ético se desarrolla un debate, producido por las técnicas de obtención de células madre, uno de los aspectos más interesantes en relación con la medicina reparadora ha sido la búsqueda, en los últimos años, de procedimientos alternativos que no requirieran la utilización de embriones, para así evitar estas dificultades éticas derivadas de su uso. Esto se ha conseguido al demostrar la existencia de células madre en diversos tipos de tejidos (Costa J. 2005).

4.1 Células madre y membrana amniótica en medicina regenerativa.

Gracias a los últimos avances científicos se demostró que el líquido amniótico contiene células de tejidos embrionarios y extra embrionarios diferenciados y no diferenciados derivados del ectodermo, del mesodermo y del endodermo. Recientemente, se ha descrito que derivados de células amnióticas tienen la capacidad de diferenciación multipotente, y estas células han llamado la atención como una nueva fuente de células para la terapia de trasplante celular. Por otro lado, las células aisladas de la membrana amniótica se pueden diferenciar en células de las tres capas germinales, tienen baja inmunogenicidad, poseen función antiinflamatoria, y no requieren de la destrucción de embriones humanos para su aislamiento (Yu, Soncini et al. 2009), ya que su obtención se realiza de las placentas una vez que haya ocurrido el alumbramiento y cuando este tejido es desechado, debido a que no posee ninguna función para la madre ni el recién nacido . De esta manera, esquivando el debate ético comúnmente asociado con el uso de células madre embrionarias humanas, la acumulación de pruebas ahora sugiere que el amnios, que ha sido desechado después del parto junto con la placenta, sea un material biológico de gran utilidad en el campo de la medicina regenerativa (Yu, Soncini et al. 2009).

Las células madre podrían ser utilizadas en las terapias de reemplazo celular y en el tratamiento de un gran número de enfermedades humanas genéticas y degenerativas, incluyendo enfermedades del sistema hematopoyético e inmune, la diabetes, insuficiencias cardíacas, lesiones crónicas del hígado, y enfermedades neurodegenerativas, osteoarticulares, entre otras (Yu, Soncini et al. 2009).

5. Células madre derivadas del amnios.

Las células madre derivadas del amnios son de gran interés por su potencial para utilizarse en la medicina regenerativa; su plasticidad, la baja inmunogenicidad, y la falta de barreras éticas para su adquisición los hacen candidatos ideales para la restauración de los tejidos en el tratamiento de enfermedades degenerativas (Yu, Soncini et al. 2009).

La membrana amniótica se ha utilizado de manera clínica y sus células han sido ampliamente investigadas. Ningún procedimiento invasivo es necesario para obtener el amnios, porque la placenta se expulsa naturalmente después del parto. A partir del amnios humano, es posible aislar principalmente dos tipos de células, las células del epitelio amniótico (hAEC) y células mesenquimales del estroma del amnios humano (hAMSC) (Yu, Soncini et al. 2009). Estos dos tipos de células tienen un origen embriológico diferente: hAEC se derivan del ectodermo embrionario y hAMSC se originan en el mesodermo extraembrionario. Ambos han demostrado que se diferencian in vitro hacia los linajes mesodérmicos clásicos (osteogénico, condrogénica, adipogénica) (Parolini, Alviano et al. 2008).

5.1. Diferenciación de células madre del amnios.

Luego de un largo proceso iniciado en la fecundación y tras la implantación del embrión se dará origen a múltiples estructuras las cuales son fundamentales para la viabilidad del nuevo ser, entre ellas se puede mencionar la placenta y sus membranas (corion y amnios), las que actualmente han recibido una atención especial como fuente de células madre adultas con multi y pluripotencia de diferenciación. (Carmen L. Insausti 2010).

Es importante indicar que en términos generales el proceso biológico de diferenciación celular es la traducción de múltiples procesos nucleares y citoplasmáticos que determinan cambios complejos y fundamentales en la ultraestructura, bioquímica y fisiología celular (Cornejo R. 2010).

Se ha demostrado que el epitelio amniótico puede diferenciarse en tejido neuronal (línea ectodérmica) el cual tuvo expresión evidente por RT-PCR de genes específicos neuronales (Miki, Lehmann et al. 2005), observándose que las células que fueron expuestas a diferenciación neuronal adquieren una forma elongada, morfología neuronal, el 90% reacciona a GFAP (la proteína glial fibrilar ácida) un marcador para línea de células gliales y 5% a CNP (nucleótidos cíclicos de fosfodiesterasa) un marcador de la línea de oligodendrocitos (Miki, Lehmann et al. 2005).

También se han hecho otras investigaciones sobre este tipo de diferenciación neuronal donde se observaron que estas células tienen la capacidad de sintetizar y liberar acetilcolina, catecolaminas y dopamina (Elwan and Sakuragawa 1997) (Kakishita, Elwan et al. 2000) lo que podría servir en la terapia de algunas enfermedades neuronales degenerativas.

Otro tipo de diferenciación del epitelio amniótico es la pancreática, de origen endodérmica, siendo demostrado a través RT-PCR por la temprana expresión del factor de transcripción PDX-1 y después con los factores PAX-6, NKZ2.2 y la expresión de genes tales como insulina y glucagón (Miki, Lehmann et al. 2005).

La diferenciación hepática también se ha observado derivada del epitelio amniótico (línea endodérmica) la cual tuvo una expresión cuantitativa con RT-PCR de mRNA de albúmina y de genes (alfa)-1 antitripsina ((alfa)-1 AT), la producción de proteínas y pruebas de actividad funcional (Miki, Lehmann et al. 2005). Otro estudio sobre este tipo de diferenciación fue el efectuado por Sakuragawa el año 2000, el cual reportó que el cultivo de células epiteliales del amnios produjo albúmina y alfa-fetoproteínas, y células similares a hepatocitos, las células con inmunohistoquímica positiva para albúmina y alfa-fetoproteínas podrían ser identificadas como integrantes en el parénquima del hígado en ratón (Sakuragawa, Enosawa et al. 2000).

Y por último la diferenciación a células cardíacas (línea mesodérmica) fue evaluada a través de la determinación con RT-PCR de genes relacionados con cardiomiocitos. Se ha demostrado la presencia de genes de la cadena ligera de miosina. (Miki, Lehmann et al. 2005).

Por otro lado como se menciona anteriormente están las células del mesénquima amniótico las cuales producen otro tipo de líneas celulares y al igual que las células epiteliales del amnios son pluripotentes (Parolini, Alviano et al. 2008).

Las células mesenquimáticas amnióticas son capaces de diferenciarse “in vitro” en condiciones estándares de cultivo, hacia las tres líneas básicas que exige el Comité de las células madre mesenquimales de tejido de la Sociedad Internacional para la terapia celular: Osteoblastos, Adipocitos y Condrocitos (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

La diferenciación Osteoblástica ha quedado demostrada en la primera semana de inducción, por los cambios morfológicos y más tarde por la formación de una matriz mineralizada. También se demostró depósitos de calcio con la coloración de Von Kossa (Steigman and Fauza 2007).

La diferenciación Adipogénica fue evidenciada por la presencia de células adiposas simples multivacuoladas, uniéndose en colonias pequeñas y grandes, cuyo tamaño creció con el tiempo de inducción. Los agregados de mayor tamaño de gotas segregadas de lípidos neutros, se teñían intensamente con Red oil O, (Int´Anker P. 2004) colorante específico de lípidos.

Diferenciación condrogénica se demostró después de tres semanas de la inducción por la aparición de una abundante matriz extracelular cartilaginosa cuya naturaleza era demostrada por la coloración por azul de alcian o por análisis de inmunocitoquímica de colágeno de tipo II, específico del cartílago (Portmann-Lanz, Schoeberlein et al. 2006).

6. Investigaciones de la membrana amniótica.

Han existido diversos estudios acerca de la membrana amniótica y su utilización de células epiteliales, teniendo una mirada en la medicina regenerativa, a continuación mencionaremos alguno de ellos.

Las membranas fetales humanas ¿Una fuente de células madre para la regeneración y reparación de tejidos? (Ilancheran S. 2009)

Hoy en día la investigación de células madre es una base fundamental para la terapia celular, gracias a la capacidad regenerativa y reparadora que poseen estas células. Asimismo, una característica esencial, para que las células madre sean utilizadas en la terapia celular, es su capacidad de diferenciarse en linajes celulares in vitro y reconstruir tejidos in vivo. Lamentablemente la obtención de estas células está asociada a problemas tanto económicos como éticos, que dificultan su utilización. Debido a esto es que se comienzan a investigar las membranas fetales como fuente de células madre, ya que poseen varias ventajas; son un suministro ilimitado, de fácil acceso, con pocos problemas éticos y jurídicos asociados a su uso y son tejidos inmuno privilegiados. (Ilancheran S. 2009)

Gracias a estudios recientes, se ha demostrado que las hACS (células madre amnióticas humanas) y las hCSC (células madre coriónicas humanas) pueden diferenciarse en varios linajes celulares tales como condroblastos, osteoblastos, adipocitos y miocitos, que son células dentro del linaje del mesodermo y también células neuronales que derivan del ectodermo (Sakuragawa, Kakinuma et al. 2004) (In 't Anker, Scherjon et al. 2004). Aún así, las hCSC se diferencian en mayor porcentaje en células osteogénicas, condrogénicas y miogénicas, mientras que las hASC más en adipocitos y en células neurogénicas, y también en otros linajes importantes que son las células endoteliales, hepatocitos y cardiomiocitos. Igualmente in vitro, tanto en cultivos primarios como en el pasaje 1, las hASC presentan diferenciación en linajes derivados del ectodermo (células neuronales y astrocitos), mesodermo (osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos y miocitos) y

endodermo (hepatocitos y células pancreáticas) (Portmann-Lanz, Schoeberlein et al. 2006).

Por otro lado se ha estudiado que las hASC expresan diversos marcadores, dependiendo del linaje, por ejemplo en el linaje neurogénico se expresan marcadores de células neuronales y gliales, y marcadores del desarrollo neuronal como MAP2 y GFAP (Sakuragawa, Kakinuma et al. 2004). En el linaje cardiogénico se expresan genes cardíacos como GATA-4, entre otros (Zhao, Ise et al. 2005). Y en el linaje hepatogénico se expresan ARNm típico de los hepatocitos como la albúmina, alfa-fetoproteína y otros genes hepatogénicos. (Tamagawa, Oi et al. 2007), (Takashima, Ise et al. 2004).

Estos hallazgos sugieren que las hAEC producen factores y/o crean un microambiente para la reparación efectiva de los tejidos y/o la regeneración, posiblemente mediante la estimulación endógena de las poblaciones de células madre, por lo menos en algunos estados patológicos. (Ilancheran S. 2009)

Potencial de diferenciación neuronal de células epiteliales amnióticas de rata
(Shinya, Komuro et al. 2010)

El amnios se desarrolla a partir del epiblasto, de la parte anteromedial, de la cual se especifica para formar la placa neural. Estudios previos han demostrado que es probable que las AEC puedan diferenciarse en linajes neuronales. Por lo tanto, la terapia de la transferencia del AE puede ser una estrategia terapéutica atractiva para los trastornos perinatales neurogénicos. Los autores investigaron el potencial de diferenciación neuronal de las células madre amnióticas epiteliales de rata mediante la realización de experimentos de diferenciación in vitro. (Shinya, Komuro et al. 2010)

En este estudio, las AEC de ratas expresaron nestina y vimentina. Nestina es un marcador específico de líneas neuroectodérmicas y vimentina se expresa en las células mesenquimales. Estudios recientes han demostrado que vimentina no sólo

está presente en todos los tejidos mesenquimales, sino que también aparece de forma transitoria en una variedad de células durante el desarrollo y puede ser co-expresada con nestina en el SNC. Estudios previos han demostrado que hAEC expresan proteínas que se encuentran en progenitores indiferenciados como nestina y vimentina. Estos hechos sugieren el potencial de las AEC para someterse a la diferenciación neuronal. (Shinya, Komuro et al. 2010)

Células mesenquimales del amnios humano diferenciadas a condrocitos (Wei, Nawata et al. 2009)

Es bien sabido que el cartílago dañado tiene una respuesta limitada a la reparación espontánea. Un daño o enfermedad del cartílago articular con frecuencia conduce a una debilitación progresiva, dando lugar a una marcada disminución en la calidad de vida.

La osteoartritis es una enfermedad con alta incidencia entre los adultos mayores, y es un objetivo importante de la ingeniería de tejidos mejorar la calidad de vida de los pacientes con patologías osteoarticulares (Worster A. 2001).

Se han utilizado diferentes métodos para el tratamiento de estas enfermedades entre los que encontramos, el uso del trasplante de condrocitos el cual es limitado, por la necesidad de una gran cantidad de células para realizarlo además del riesgo de rechazo, y la escasez de donantes (Pittenger M.F. 1999).

Las células utilizadas en la reparación de cartílago son las células mesenquimales del amnios humano (hAMC) las que poseen pluripotencia, y por lo tanto sería un buen candidato para una fuente alternativa de células para la terapia de trasplante celular. (Dominici, Le Blanc et al. 2006)

En este estudio se utilizaron hAMC, las cuales fueron estimuladas con la proteína recombinante morfogenética ósea humano 2, luego fue evaluado el potencial de las células a diferenciarse en condrocitos. Posteriormente pudiendo determinar la expresión de marcadores específicos condrogénicos. (Wei, Nawata et al. 2009)

Cultivo y caracterización de las células epiteliales de la mucosa oral en membrana amniótica humana para la reconstrucción de la superficie ocular (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

Las células madre que están alrededor de la cornea son responsables de la regeneración del epitelio corneal y existen condiciones en las cuales estas células se pierden, como por ejemplo lesiones químicas o térmicas, radiación ionizantes o ultravioleta, infecciones microbianas severas y crioterapia en la región limbal, entre otras. Esto nos lleva a una deficiencia de las células madre limbales (DCML) lo que podrían llevar a la ceguera. (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

Al ocurrir una DCML, puede ser tratada con el trasplante de tejido límbico de un ojo sano, ya sea por transferencia directa o de un cultivo in vitro en una matriz adecuada, como la membrana amniótica. (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

El epitelio corneal es de tipo escamoso estratificado, por lo que existen varias células epiteliales con morfología similar. (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

Se realizaron biopsias orales, limbales y conjuntivales, la membrana amniótica fue obtenida de cesáreas, el corion fue separado del amnios y este se depositó en un portaobjetos y sobre la membrana amniótica desepitelizada se depositaron los cultivos de células orales, limbales y conjuntivales, a este cultivo se le realizaron técnicas de tinción, microscopía electrónica y técnica moleculares. (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

Las células epiteliales orales pueden ser cultivadas como explantes de membrana amniótica desepitelizada. Los explantes son tejidos removidos de un organismo y transferido para su crecimiento a un medio artificial de nutrientes) La caracterización demostró que estas células mantienen las características fenotípicas de las células epiteliales orales y que el cultivo es una población heterogénea de células diferenciadas y células madre. Se mostró que el cultivo de células epiteliales orales son útiles para la reconstrucción de la superficie ocular

en pacientes con enfermedades de la superficie ocular bilateral. (Madhira, Vemuganti et al. 2008)

Efecto de las citoquinas derivadas de las células del amnios en la curación de quemaduras de espesor parcial (Payne, Wachtel et al. 2010)

Las células progenitoras multipotentes derivadas del Amnios (AMP) son la base de una plataforma tecnológica que se está desarrollando para el tratamiento de quemaduras (Xing L 2007). Estas, aisladas de la placenta de término, se encuentran disponibles en abundancia.

Las células madre, producen factores de crecimiento de citoquinas que sirven como mediadores para los procesos celulares para la curación de heridas (Han SK 2005).

La solución de citoquinas derivadas del amnios (ACCS), es un producto secretado por las células AMP existente a nivel fisiológico (Steed DL 2008). La ACCS podría ser utilizada para tratar cuatro tipos de quemaduras:

- Quemadura de espesor parcial: Si se protege puede cicatrizar por epitelización.
- Quemadura total
- Heridas intersticiales: Vistas en los injertos de piel mallada.
- Zona de la piel de los donantes de injertos (Payne, Wachtel et al. 2010).

Se logro demostrar que la adición de las células AMP fue beneficiosa, manifestándose con la aceleración de la curación de quemaduras de espesor parcial experimental que mejoró cuando las células AMP estuvieron presentes permitiendo la secreción continua de ACCS. (Payne, Wachtel et al. 2010)

En resumen, dentro de los estudios mencionados anteriormente, podemos determinar que una importante característica del tejido amniótico es su capacidad de diferenciarse en linajes celulares in vitro y reconstruir tejidos in vivo en presencia de alguna patología.

A partir de lo anteriormente señalado, se ha demostrado que las células madres amnióticas pueden diferenciarse en varios linajes celulares del mesodermo y del ectodermo, utilizándose en múltiples terapias regenerativas tales como; reconstrucción de la superficie ocular, tratamiento de enfermedades osteoarticulares, quemaduras epiteliales e incluso en regeneración neuronal.

En Chile el número de nacimientos en el año 2009 fue 252.240, el 40,4% de los nacimientos se registran en la Región Metropolitana, 11,2% en Biobío y 9,4% en Valparaíso, aportando estas tres regiones en conjunto el 61,0% del total de nacimientos. Las restantes regiones aportan entre menos de 1 (Aysén, Magallanes y Antártica) y menos de 6 (Maule y La Araucanía) nacimientos vivos por cada cien del total de nacidos del país. (INE 2009)

El 9,4% de nacimientos anuales en la región de Valparaíso (23.735 nacimientos) corresponde a la tercera región con más nacimientos del país. Ya sea vía parto vaginal o parto cesárea, las placentas obtenidas tras estos nacimientos son consideradas por el reglamento REAS (reglamento sobre residuos de establecimientos de salud) (ver anexo F) como desechos orgánicos, la cual es eliminada e incinerada por empresas particulares en un gran número de hospitales.

Según el Código sanitario, en el artículo 153 “las placentas y otros órganos y tejidos que determinen el reglamento podrán destinarse a la elaboración de productos terapéuticos y a otros usos que el mismo reglamento indique” (ver anexo E) (Gobierno de Chile 2010). Considerando lo anterior, se puede decir que no existe ningún artículo que impida la utilización de este tejido para fines científicos, por lo cual, existe una gran fuente de investigación para fines terapéuticos y científicos que no es utilizada y que es desaprovechada en nuestro país. Por esta razón, a través de esta investigación, fueron elaborados protocolos de extracción de células madre a partir de amnios humano.

Capítulo 2

1. Delimitación del problema, tipos de estudio y objetivos.

1.1. Delimitación del problema.

Protocolizar la obtención de células madre epiteliales de membrana amniótica humana y el posterior cultivo de estas células. Además de identificar y evaluar la morfología y viabilidad celular in vitro.

1.2. Tipo de estudio.

Experimental descriptivo.

1.3. Objetivo General.

Generar protocolos de extracción y cultivos in vitro de células madre amnióticas humanas para su posterior diferenciación y uso en medicina regenerativa.

Comparar morfología y viabilidad celular según los distintos protocolos de extracción y cultivo de células madre a partir de la membrana amniótica.

1.4. Objetivos específicos.

- Establecer protocolos de extracción, separación y cultivo de células madre a partir de la membrana amniótica humana.
- Determinar la viabilidad celular a través de técnicas colorimétricas (tinciones e inmunohistoquímica) de las células madre amnióticas humanas en diferentes pasajes y condiciones de cultivo.
- Caracterizar a través de la morfología las células madre obtenidas a partir de la membrana amniótica humana.

1.5. Criterios de inclusión.

Se utilizaron placentas de gestantes que tuvieron su parto en el Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso y que cumplieron con las siguientes variables clínicas:

- Edad gestacional entre 37 y 40+6 semanas.
- Edad materna entre 18 y 40 años.
- Paridad: Primigestas y multíparas.
- Tipo de parto: Vaginal y cesárea.

1.6 Criterios de exclusión.

Las siguientes gestaciones y urgencias obstétricas se excluyeron, debido a que podrían generar alteraciones placentarias (isquemia, infecciones, envejecimiento placentario, etc.) que podrían afectar el protocolo de extracción de células madre y en el cultivo de estas.

1. Gestaciones de alto riesgo, tales como:

- Síndrome hipertensivo del embarazo.
- Diabetes gestacional.
- Restricción del crecimiento intrauterino.
- Rotura prematura de membranas.
- Gestación de post-término.
- Gestación gemelar.
- Patologías genéticas, etc.

2. Urgencias obstétricas, tales como:

- Desprendimiento prematuro de placenta normoinserta.
- Parto prematuro.
- Sufrimiento fetal agudo.
- Meconio (+++).

3. Hábito tabáquico, alcohol y drogas de la madre durante la gestación.

1.7 Variables clínicas.

1. Edad gestacional: Sistema estandarizado que utiliza el tiempo estimado en semanas desde el primer día de la última menstruación hasta el término de la gestación y que cuantifica el progreso de este. Esta variable se clasificará de la siguiente forma:
 - Pre – término (Gestación menor de 36 semanas)
 - Término (Gestación entre 37 – 40 semanas)
 - Post – término (Gestación de más de 41 semanas).

2. Edad materna: Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo, en este caso la gestante. Esta variable se clasificará de la siguiente forma:
 - Edad comprendida entre 12 – 19 años
 - Edad comprendida entre 20 – 35 años
 - Edad comprendida entre 35 - 50 años.

3. Paridad: Número de gestaciones previas a la actual. Esta variable se clasificará de la siguiente forma:
 - Primigesta: Mujer que cursa su primera gestación.
 - Multípara: Mujer con uno o más partos previos.

4. Tipo de Parto: Forma en que puede terminar una gestación y que puede ser de las siguientes formas:
 - Cesárea: Tipo de parto en el cual se realiza una incisión quirúrgica en el abdomen y útero materno para extraer uno o más fetos.
 - Parto vaginal: Tipo de parto en el cual el feto nace a través del canal del parto (vagina).

2. Material y método

2.1 Obtención de Membrana amniótica humana:

Para este estudio se utilizaron placentas humanas, las cuales se obtuvieron de partos vaginales y partos cesáreas realizados en el hospital Carlos Van Buren de Valparaíso durante el año 2010-2011 y que contó con la colaboración del Dr. Marcelo Rodríguez, encargado de la Unidad de Perinatología del mismo Hospital, para la obtención de las muestras.

Para la obtención de la membrana amniótica, no fue necesaria la solicitud de una autorización del comité de ética, ya que el código sanitario, en el artículo 153 (ver anexo E) autoriza la utilización de placentas, órganos u otros tejidos para usos terapéuticos.

La obtención de placentas humanas fue inmediata tras el alumbramiento lo que permitió trabajar con ellas dentro del hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, en un área del servicio de Maternidad, de manera de obtener la muestra requerida (membrana amniótica de la placa basal de la placenta humana) y eliminar el resto de placenta en el depósito de desechos biológicos del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso.

2.2 Procesamiento de tejidos:

Las placentas humanas fueron recolectadas entre los meses de diciembre del 2010 a noviembre del 2011. Cuando fueron conseguidas las placentas, se les extrajo la membrana amniótica ubicada en la placa basal utilizando técnica estéril. Una vez obtenida la membrana amniótica, se quitaron los restos placentarios y coágulos de sangre utilizando medio de transporte y fueron depositadas en frascos con la misma solución para ser trasladadas al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valparaíso (CIB). Una vez en el Centro, se procesó la membrana de acuerdo al protocolo de extracción de células madre epiteliales de amnios humano, el cual fue variando de manera experimental hasta

obtener la mayor cantidad de células. Las células fueron sembradas en placas de cultivo y se les agregó medio de cultivo estándar Epilife Mepi 500 CA más suplemento S7, amphotericina B y penicilina. Estos cultivos se mantuvieron incubados a 37°C y a 5% CO₂.

Los medios de cultivo fueron cambiados cada 48 horas, previa evaluación de los cultivos celulares, utilizando técnica limpia y en una campana de flujo laminar, de manera de evitar formas de contaminación.

A los cultivos celulares les fueron aplicadas diferentes técnicas; tinción hematoxilina eosina, inmunohistoquímica en cultivo celular y fijación de cultivos celulares, además se realizaron cortes histológicos, a los cuales se les aplicó la técnica de tinción hematoxilina – eosina e inmunohistoquímica en corte histológico. Todas estas técnicas se utilizaron para comprobar viabilidad, caracterización e identificación de la morfología de las células obtenidas.

3. Métodos.

3.1 Protocolo N°1

Obtención y transporte de tejido amniótico.

Materiales

- Bandeja estéril.
- Pinza estéril.
- Tijera estéril.
- Bisturí estéril.
- Guantes estériles.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra).
- Medio de transporte (Solución salina equilibrada de HBSS, calcio y magnesio-libre; CMF-HBSS) más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.

La obtención de membrana amniótica debe ser inmediata tras el parto (ya sea parto vaginal o parto cesárea).

Previo a la obtención de la membrana amniótica se debe preparar un área estéril para la disección del tejido, esta área tendrá preparada una bandeja estéril, tijera estéril, pinza estéril y bisturí estéril.

Para realizar la disección del tejido, realizar lavado de manos clínico y utilizar guantes estériles.

La placenta humana es depositada en un campo estéril, con la superficie fetal hacia arriba. En esta posición, la membrana amniótica se estira sobre la superficie de la placenta.

Para comenzar la disección, tomar el cordón umbilical y estrujarlo para retirar la sangre que contenga, luego cortarlo con la tijera estéril desde su inserción placentaria. Con el bisturí estéril, realizar un corte en cruz sobre la base de la cara

fetal de la placenta, este corte debe ser suave, de manera de cortar solamente amnios y no corion. Comenzar a separar suavemente la membrana amniótica del corion, desde el borde de la inserción del cordón umbilical hasta el borde externo de la placenta, se pueden utilizar pinzas estériles para facilitar el procedimiento.

Las muestras de membrana amniótica se depositan en un frasco estéril y se lavan con medio de transporte, de manera de retirar coágulos de sangre.

Las muestras son transportadas en frascos estériles con medio de transporte, a temperatura ambiente. El traslado debe ser rápido (aproximadamente 10 minutos).

Extracción de células madre epiteliales de amnios humano.

Materiales

- Etanol al 70%.
- Tripsina /EDTA 0,05% (w/v).
- Medio de cultivo estándar Hyclone DMEN/HIGH glucose 1000ml más suero fetal bovino, amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Solución salina equilibrada de HBSS más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Tampón de pre-digestión (HBSS más ETHyleneglycol-bis)
- Campana de flujo laminar (BSL-2).
- Pinzas estériles.
- Guantes de procedimiento.
- Guantes estériles.
- Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50 ml.
- Centrifuga refrigerada.
- Riñón metálico estéril.

Procedimientos

- Para manipular el amnios humano se trabaja bajo una campana de flujo laminar, de manera de conservar la asepsia y evitar contaminación.
- La muestra se deposita en un riñón metálico estéril y es lavada con medio de transporte hasta que quede libre de coágulos de sangre (el amnios puede ser masajeador con los dedos para ayudar en el lavado).
- Colocar el amnios en un tubo de centrifuga estéril y añadir 20 ml de tampón de pre-digestión.
- Mover suavemente la membrana en la solución durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Transferir la membrana con una pinza estéril a dos nuevos tubos. Añadir 20 ml de tampón de pre-digestión en cada uno de los tubos. Incubar 10 min a 37°C.
- Retirar la solución de pre-digestión de la estufa y transferir la membrana a 2 nuevos tubos, agregar 30 ml de tripsina/ EDTA. Incubar durante 40 min a 37°C. Guardar el digerido de la pre-digestión.
- Retirar la solución de tripsina de la estufa y transferir nuevamente la membrana a 2 tubos con 30 ml de tripsina/ EDTA, pero en este caso la membrana se comprime con los dedos, de manera de retirar la tripsina sobrante de la membrana. Guardar el digerido de tripsina.
- Incubar los nuevos tubos con la membrana durante 40 min a 37°C.
- Retirar la solución de tripsina de la estufa y transferir la membrana a un frasco estéril para congelar, previa compresión de la membrana para retirar la tripsina sobrante. Guardar el digerido de tripsina.
- Agregar medio de cultivo a todos los digeridos, de manera que los tubos queden con el mismo volumen.
- De los digeridos de tripsina y del tampón de pre digestión que fueron guardados, centrifugar durante 10 min a 200 rpm a 4°C.

- Luego de la centrifugación, los tubos quedan con un pellet de células. Para sembrar las células obtenidas, se debe retirar la cantidad de tripsina que queda por decantación dejando el pellet de células en la base del tubo.
- Agregar 5 ml de medio de cultivo a la solución y homogeneizar la solución con una pipeta.
- Para contar las células obtenidas, extraer 100 μ l de la solución y mezclar con 100 μ l de azul tripano en un Eppendorf.
- Extraer 10 μ l y colocar la solución en una cámara de Neubauer. Contar las células.
- Luego pasar las células a una placa de cultivo con 10 ml de medio de cultivo estándar y 5 ml en otra placa más pequeña.

Mantenimiento de cultivo celular.

Los medios de cultivo fueron cambiados cada 48 horas, previa evaluación de los cultivos celulares, utilizando técnica limpia y en una campana de flujo laminar, de manera de evitar formas de contaminación. Cada placa se lava con PBS para quitar los restos membranosos previo al cambio de medio de cultivo. Incubar las placas a 37°C y 5% de CO₂.

3.2 Protocolo N°2

Obtención y transporte de tejido amniótico.

Materiales

- Bandeja estéril.
- Pinza estéril.
- Tijera estéril.
- Bisturí estéril.
- Guantes estériles.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra).
- Medio de transporte (Solución salina equilibrada de HBSS, calcio y magnesio-libre; CMF-HBSS) más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.

La obtención de membrana amniótica debe ser inmediata tras el parto (ya sea parto vaginal o parto cesárea).

Previo a la obtención de la membrana amniótica se debe preparar un área estéril para la disección del tejido, esta área tendrá preparada una bandeja estéril, tijera estéril, pinza estéril y bisturí estéril.

Para realizar la disección del tejido, realizar lavado de manos clínico y utilizar guantes estériles.

La placenta humana es depositada en un campo estéril, con la superficie fetal hacia arriba. En esta posición, la membrana amniótica se estira sobre la superficie de la placenta.

Para comenzar la disección, tomar el cordón umbilical y estrujarlo para retirar la sangre que contenga, luego cortarlo con la tijera estéril desde su inserción placentaria. Con el bisturí estéril, realizar un corte en cruz sobre la base de la cara fetal de la placenta, este corte debe ser suave, de manera de cortar solamente amnios y no corion. Comenzar a separar suavemente la membrana amniótica del

corion, desde el borde de la inserción del cordón umbilical hasta el borde externo de la placenta, se pueden utilizar pinzas estériles para facilitar el procedimiento.

Las muestras de membrana amniótica se depositan en un frasco estéril y se lavan con medio de transporte, de manera de retirar coágulos de sangre.

Las muestras son transportadas en frascos estériles con medio de transporte, a temperatura ambiente. El traslado debe ser rápido (aproximadamente 10 minutos).

Extracción de células madre epiteliales de amnios humano.

Materiales

- Etanol al 70%.
- Tripsina /EDTA 0,05%.
- Medio de cultivo estándar Hyclone DMEN/HIGH glucose 1000ml más suero fetal bovino, amphotericina B 250 µg/ml, penicilina 10.000 µg/ml y 2 mercaptoethanol.
- EGF (factor de crecimiento epitelial) más 0,1mg/ml de PBS BSA.
- Solución salina equilibrada de HBSS más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Campana de flujo laminar (BSL-2).
- Pinzas estériles.
- Guantes estériles.
- Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50ml.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra).
- Filtros BD Falcon cell strainer de 100 µm nylon.
- Centrifuga refrigerada.
- Riñón metálico estéril.

Procedimientos

- Para manipular el amnios humano se trabaja bajo una campana de flujo laminar, de manera de conservar la asepsia y evitar contaminación.
- La muestra se deposita en un riñón metálico estéril y es lavada con medio de transporte hasta que quede libre de coágulos de sangre (el amnios puede ser masajeadó con los dedos para ayudar en el lavado).
- Colocar el amnios en un tubo de centrifuga estéril y añadir 20 ml de tampón de pre-digestión.
- Mover suavemente la membrana en la solución durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Transferir la membrana con una pinza estéril a dos nuevos tubos. Añadir 20 ml de tampón de pre-digestión en cada uno de los tubos. Incubar 10 min a 37°C en agitación.
- Retirar la solución de pre digestión de la estufa y transferir la membrana a 2 nuevos tubos, agregar 30 ml de tripsina/ EDTA. Incubar durante 40 min a 37°C en agitación.
- Retirar la solución de tripsina de la estufa y transferir nuevamente la membrana a 2 tubos con 30 ml de tripsina/ EDTA, pero en este caso la membrana se comprime con los dedos, de manera de retirar la tripsina sobrante en la membrana.
- Tomar los digeridos de la tripsina y traspasarlos a 2 nuevos tubos a través de un filtro de 100 µm y centrifugar durante 10 min a 300 rpm, a 4°C.
- Incubar los nuevos tubos con la membrana durante 40 min a 37°C en agitación.
- Retirar la solución de tripsina de la estufa y transferir la membrana a un frasco estéril para congelar, previa compresión de la membrana para retirar la tripsina sobrante.
- Tomar los digeridos de la tripsina, pasarlo a través de los filtros y centrifugar durante 10 min a 300 rpm, a 4°C.

- Luego de la centrifugación, los tubos quedan con un pellet de células. Para sembrar las células obtenidas, se debe retirar la cantidad de tripsina que queda por decantación dejando el pellet de células en la base del tubo.
- Agregar 5 ml de medio de cultivo a la solución y homogeneizar la solución con una pipeta.
- Para contar las células obtenidas, extraer 100 μ l de la solución y mezclar con 100 μ l de azul tripano en un Eppendorf.
- Extraer 10 μ l y colocar la solución en una cámara de Neubauer. Contar las células.
- Luego pasar las células a las placas de cultivo con 5ml de medio de cultivo estándar y agregar 1 μ l de EGF.

Mantenimiento de cultivo celular.

Los medios de cultivo fueron cambiados cada 48 horas, previa evaluación de los cultivos celulares, utilizando técnica limpia y en una campana de flujo laminar, de manera de evitar formas de contaminación. Incubar las placas a 37°C y 5% de CO₂.

3.3 Protocolo N°3.

Obtención y transporte de tejido amniótico.

Materiales

- Bandeja estéril.
- Pinza estéril.
- Tijera estéril.
- Bisturí estéril.
- Guantes estériles.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra).
- Medio de transporte (Solución salina equilibrada de HBSS, calcio y magnesio-libre; CMF-HBSS) más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.

La obtención de membrana amniótica debe ser inmediata tras el parto (ya sea parto vaginal o parto cesárea).

Previo a la obtención de la membrana amniótica se debe preparar un área estéril para la disección del tejido, esta área tendrá preparada una bandeja estéril, tijera estéril, pinza estéril y bisturí estéril.

Para realizar la disección del tejido, realizar lavado de manos clínico y utilizar guantes estériles.

La placenta humana es depositada en un campo estéril, con la superficie fetal hacia arriba. En esta posición, la membrana amniótica se estira sobre la superficie de la placenta.

Para comenzar la disección, tomar el cordón umbilical y estrujarlo para retirar la sangre que contenga, luego cortarlo con la tijera estéril desde su inserción placentaria. Con el bisturí estéril, realizar un corte en cruz sobre la base de la cara fetal de la placenta, este corte debe ser suave, de manera de cortar solamente amnios y no corion. Comenzar a separar suavemente la membrana amniótica del

corion, desde el borde de la inserción del cordón umbilical hasta el borde externo de la placenta, se pueden utilizar pinzas estériles para facilitar el procedimiento.

Las muestras de membrana amniótica se depositan en un frasco estéril y se lavan con medio de transporte, de manera de retirar coágulos de sangre.

Las muestras son transportadas en frascos estériles con medio de transporte, a temperatura ambiente. El traslado debe ser rápido (aproximadamente 10 minutos).

Extracción de células madre epiteliales de amnios humano.

Materiales

- Etanol al 70%.
- Tripsina /EDTA 0,05%.
- Medio de cultivo estándar Epilife Mepi 500 CA 500ml más, suplemento S7 100X 5ml amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Solución salina equilibrada de HBSS más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Campana de flujo laminar (BSL-2).
- Pinzas estériles.
- Guantes estériles.
- Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50ml.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra)
- Filtros BD Falcon cell strainer de 100 µm nylon
- Centrifuga refrigerada.
- Riñón metálico estéril.

Procedimientos

- Para manipular el amnios humano se trabaja bajo una campana de flujo laminar, de manera de conservar la asepsia y evitar contaminación.
- La muestra se deposita en un riñón metálico estéril y es lavada con medio de transporte hasta que quede libre de coágulos de sangre (el amnios puede ser masajeado con los dedos, utilizando guantes estériles, para ayudar en el lavado).
- Colocar el amnios en un frasco estéril y añadir 30 ml de tripsina/EDTA. Incubar 15 min a 37°C en un baño termorregulador en agitación.
- Transferir la membrana a un nuevo frasco estéril y agregar 70 ml de tripsina/EDTA. Incubar durante 60 min a 37°C en un baño termorregulador en agitación. Guardar digeridos de tripsina.
- Retirar la membrana de la estufa y transferirla a un frasco estéril con 70 ml de tripsina/EDTA e incubar durante 60 min a 37°C en un baño termorregulador en agitación. Guardar digeridos de tripsina.
- Tomar los digeridos de la primera tripsina y transferirlos a dos tubos cónicos a través de filtros de 100 µm.
- Centrifugar durante 10 min a 1000 rpm, a temperatura ambiente. Realizar el mismo procedimiento con los digeridos de la segunda tripsina.
- Luego de la centrifugación, los tubos quedan con un pellet de células.
- Para sembrar las células obtenidas, se debe retirar la cantidad de tripsina que queda por decantación dejando el pellet de células, agregar 3 ml de cultivo, homogeneizar la solución con una pipeta.

- Para contar las células obtenidas, extraer 100 μ l de la solución y mezclar con 100 μ l de azul tripano en un Eppendorf. Extraer 10 μ l y colocar la solución en una cámara de Neubauer. Contar las células.
- Luego pasar las células a las placas de cultivo con 3ml de medio de cultivo estándar Epilife Mepi 500 CA 500ml más, suplemento S7 100X 5ml amphotericina B 250 μ g/ml y penicilina 10.000 μ g/ml.

Mantención de cultivo celular.

Los medios de cultivo fueron cambiados cada 48 horas, previa evaluación de los cultivos celulares, utilizando técnica limpia y en una campana de flujo laminar, de manera de evitar formas de contaminación. Incubar las placas a 37°C y 5% de CO₂.

3.4 Protocolo N°4.

Obtención y transporte de tejido amniótico.

Materiales

- Bandeja estéril.
- Pinza estéril.
- Tijera estéril.
- Bisturí estéril.
- Guantes estériles.
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra).
- Medio de transporte (Solución salina equilibrada de HBSS, calcio y magnesio-libre; CMF-HBSS) más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.

La obtención de membrana amniótica debe ser inmediata tras el parto (ya sea parto vaginal o parto cesárea).

Previo a la obtención de la membrana amniótica se debe preparar un área estéril para la disección del tejido, esta área tendrá preparada una bandeja estéril, tijera estéril, pinza estéril y bisturí estéril.

Para realizar la disección del tejido, realizar lavado de manos clínico y utilizar guantes estériles.

La placenta humana es depositada en un campo estéril, con la superficie fetal hacia arriba. En esta posición, la membrana amniótica se estira sobre la superficie de la placenta.

Para comenzar la disección, tomar el cordón umbilical y estrujarlo para retirar la sangre que contenga, luego cortarlo con la tijera estéril desde su inserción placentaria. Con el bisturí estéril, realizar un corte en cruz sobre la base de la cara fetal de la placenta, este corte debe ser suave, de manera de cortar solamente amnios y no corion. Comenzar a separar suavemente la membrana amniótica del

corion, desde el borde de la inserción del cordón umbilical hasta el borde externo de la placenta, se pueden utilizar pinzas estériles para facilitar el procedimiento.

Las muestras de membrana amniótica se depositan en un frasco estéril y se lavan con medio de transporte, de manera de retirar coágulos de sangre.

Las muestras son transportadas en frascos estériles con medio de transporte, a temperatura ambiente. El traslado debe ser rápido (aproximadamente 10 minutos).

Extracción de células madre epiteliales de amnios humano.

Materiales

- Etanol al 70%.
- Tripsina /EDTA 0,05%.
- Medio de cultivo estándar Epilife Mepi 500 CA 500ml más, suplemento S7 100X 5ml amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Solución salina equilibrada de HBSS más amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml.
- Campana de flujo laminar (BSL-2).
- Pinzas estériles.
- Tijera estéril.
- Guantes estériles.
- Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50ml.
- Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 15ml
- Frascos estériles (frascos de toma de muestra)
- Filtros BD Falcon cell strainer de 75 µm nylon
- Centrifuga refrigerada.
- Riñón metálico estéril.

Procedimientos

- Para manipular el amnios humano se trabaja bajo una campana de flujo laminar, de manera de conservar la asepsia y evitar contaminación.
- La muestra se deposita en un riñón metálico estéril y es lavada con medio de transporte hasta que quede libre de coágulos de sangre (el amnios puede ser masajeado con los dedos, utilizando guantes estériles, para ayudar en el lavado).
- Cortar la membrana amniótica en trozos de 2cm x 2cm (se obtienen aproximadamente entre 20 y 25 trozos).
- Dividir la cantidad de trozos de amnios obtenidos en dos tubos de centrifuga de 50 ml, añadir 30 ml de tripsina/EDTA. Incubar 15 minutos a 37°C en un baño termorregulador en agitación.
- Transferir 3 trozos de amnios y 10 ml de tripsina/EDTA por cada tubo de centrifuga de 15ml (se obtienen aproximadamente entre 6 y 8 tubos). Incubar durante 60 min a 37°C en un baño termorregulador en agitación. Guardar digeridos de tripsina.
- Retirar la membrana de la estufa y transferir los 3 trozos de amnios de cada tubo a nuevos tubos de centrifuga de 15 ml, añadir 10 ml de tripsina/EDTA a cada tubo (se obtienen aproximadamente entre 6 y 8 tubos). Incubar durante 60 min a 37°C en un baño termorregulador en agitación. Guardar digeridos de tripsina.
- Tomar los digeridos de la primera tripsina y transferirlos a dos tubos cónicos a través de filtros de 75 µm.
- Centrifugar durante 10 min a 1000 rpm, a temperatura ambiente. Realizar el mismo procedimiento con los digeridos de la segunda tripsina.

- Luego de la centrifugación, los tubos quedan con un pellet de células.
- Para sembrar las células obtenidas, se debe retirar la cantidad de tripsina que queda por decantación dejando el pellet de células, agregar 3 ml de cultivo, homogeneizar la solución con una pipeta.
- Para contar las células obtenidas, extraer 100 μ l de la solución y mezclar con 100 μ l de azul tripano en un Eppendorf. Extraer 10 μ l y colocar la solución en una cámara de Neubauer. Contar las células.
- Luego pasar las células a las placas de cultivo con 3ml de medio de cultivo estándar Epilife Mepi 500 CA 500ml más, suplemento S7 100X 5ml amphotericina B 250 μ g/ml y penicilina 10.000 μ g/ml.

Mantenimiento de cultivo celular.

Los medios de cultivo fueron cambiados cada 48 horas, previa evaluación de los cultivos celulares, utilizando técnica limpia y en una campana de flujo laminar, de manera de evitar formas de contaminación. Incubar las placas a 37°C y 5% de CO₂.

3.5 Resumen de diferencias entre protocolos.

	Protocolo N°1	Protocolo N°2	Protocolo N°3	Protocolo N°4
Obtención y transporte	No hay cambios.	No hay cambios.	No hay cambios.	No hay cambios.
Procesos de digestión	-20 ml de tampón de pre digestión se mueve durante 30 segundos a temperatura ambiente.	- Ídem (en agitación)	NO	- Cortar amnios en trozos de 2cm x 2 cm.
	- 20 ml tampón de pre digestión se incuba durante 10 minutos a 37°C.	- Ídem (en agitación)	NO	NO
	- 30 ml de tripsina se incuba durante 40 minutos a 37°C.	- Ídem (en agitación)	-30 ml tripsina durante 15 minutos a 37°C en un baño termorregulador y en agitación.	-Ídem protocolo N°3
	-Comprimir membrana.	-Comprimir membrana.	NO	NO
	- 30 ml tripsina durante 40 minutos a 37°C	- Ídem (en agitación)	- 70 ml tripsina durante 60 minutos a 37°C en un baño termorregulador y en agitación.	- 3 trozos de amnios y 10 ml tripsina por cada tubo de 15 ml, durante 60 minutos a 37°C en un baño termorregulador y en agitación.

	NO	NO	- 70 ml tripsina durante 60 minutos a 37°C en un baño termorregulador y en agitación.	- 3 trozos de amnios y 10 ml tripsina por cada tubo de 15 ml, durante 60 minutos a 37°C en un baño termorregulador y en agitación.
	NO	- Traspasar solución a través de filtro de 100 µm.	- Ídem Protocolo N°2	- Traspasar solución a través de filtro de 75 µm.
Centrifugados	10 minutos a 200 rpm y en una temperatura de 4°C	10 minutos a 300 rpm y en una temperatura de 4°C	10 minutos a 1000 rpm y a temperatura ambiente.	- Ídem Protocolo N°3
Medio de cultivo	Medio de cultivo estándar.	Medio de cultivo estándar más 2 mercaptoethanol.	Epilife Mepi más suplemento S7.	- Ídem Protocolo N°3
Mantención	Lavar placas con PBS antes de cada cambio de medio.	NO	NO	NO

Tabla1: Diferencia entre protocolos N°1, N°2, N°3 y N°4 para la extracción de células epiteliales de amnios humano.

3.6 Caracterización histológica.

Corte histológico de Amnios: fijación de la muestra (Protocolo en anexo A)

Se procesaron muestras de membrana amniótica para caracterizar los diferentes componentes tisulares del amnios. Las muestras se fijaron en una solución de Methacarn, durante 4 horas a 4°C. Una vez fijadas, las muestras se depositaron en cassettes histológicos, de manera de facilitar su manipulación. Las muestras se deshidratan en una batería de alcoholes ascendentes y son clarificadas en xilol. Luego se impregnan en parafina por 30 minutos a 60°C. Una vez terminado este proceso se forma el taco de parafina con el tejido amniótico.

Del taco de parafina se obtienen cortes de tejido amniótico de 5 micras. Para esto se utiliza un micrótopo. Los cortes se colocan en un recipiente con una solución de agua y alcohol. Posteriormente son retirados de la solución y son depositados en un recipiente con agua a una temperatura de 40°C. Retirar la muestra del agua con un portaobjeto con polisilina, lo cual genera atracción entre el portaobjetos y el corte, sin generar presencia de burbujas entre ambos. El portaobjetos que contiene la muestra amniótica se deja secar durante una hora a 37°C.

Los cortes obtenidos se utilizan para estudiar morfología celular y de la membrana amniótica, mediante la tinción hematoxilina-eosina y también para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

Tinción Hematoxilina – Eosina (Protocolo en anexo B)

Para realizar la tinción hematoxilina-eosina se utiliza un coupling, donde se colocan los portaobjetos con las muestras de tejido amniótico, de manera de facilitar el protocolo de tinción.

Posteriormente, la muestra es desparafinada y deshidratada con una batería de xiloles y alcoholes descendentes. Cada alcohol actúa por 5 minutos y cada xilol por 3 minutos. Agregar agua destilada durante 5 minutos.

La primera tinción se realiza con hematoxilina de Mayer durante 10 segundos. Para el viraje instalar el coupling con las muestras bajo agua potable durante 5 minutos. Agregar alcohol 95% durante 2 minutos.

La segunda tinción se realiza con eosina alcohólica al 0,5%. Aplicar por un periodo corto, de 1 a 2 segundos de exposición.

Para finalizar, continuar con la deshidratación en una batería de alcoholes descendentes aplicados cada uno durante 2 minutos y xiloles aplicados por 5 minutos cada uno.

Para el montaje se tomó el portaobjetos que contiene la muestra de tejido amniótico ya teñido con hematoxilina y eosina y se le agrega medio hidrófobo, para luego colocar el cubreobjetos sobre la muestra, esto se deja secar durante 20 minutos para que el cubre objetos se adhiriera al portaobjetos.

3.7 Protocolos inmunohistoquímicos (Protocolos en anexo C)

La inmunohistoquímica es un procedimiento que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede hacer que un sustrato sea visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. (Peñafiel C, 2008)

La inmunohistoquímica fue realizada en cultivos celulares y en cortes histológicos de amnios para la identificación de proteínas asociadas al citoesqueleto del epitelio amniótico (citoqueratina) y mesénquima (vimentina).

Inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios.

Preparar los cortes histológicos según protocolo (Protocolo en anexo C).

Inmunohistoquímica en corte histológico para Vimentina.

- Colocar los cortes seleccionados en un coupling.
- Desparafinar con una batería de xiloles descendentes y deshidratar con alcoholes descendentes, lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- Realizar el bloqueo de peroxidasa al 3% (1,5 ml de peróxido de hidrógeno más 48,5 ml de PBS), mantener durante 30 minutos a 37°C y en agitación.
- Lavar los cortes con PBS durante 5 minutos, repetir 3 veces.
- Pasar los cortes a una cámara húmeda, marcar cada uno con un lápiz hidrófobo.
- Bloqueo de sitios inespecíficos. Agregar 50 µl de Cas-Block a cada corte y dejar durante 30 minutos a 25°C.
- Aplicar a cada corte 50 µl de suero normal de cabra, incubar durante 20 minutos a 25°C.
- Agregar a cada corte 40 µl de anticuerpo primario, el cual es, en este caso, Vimentina (RTU de vector), incubar durante 12 horas a 4°C.
- Traspasar los cortes al coupling y lavarlos con PBS durante 5 minutos, repetir 3 veces.
- Nuevamente colocar los cortes en la cámara húmeda y agregar 40 µl de anticuerpo secundario (anticuerpo anti-conejo hecho en cabra, 1:500), incubar durante 1 hora a 25°C.
- Traspasar los cortes al coupling y lavarlos con PBS durante 5 minutos, repetir 3 veces.
- Revelación Peroxidasa, para esto se utiliza un kit de revelado (Kit NovaRed Vector), el cual contiene 4 soluciones. La primera y la segunda son desconocidas. La tercera es el cromógeno, que en este caso será aminoetilcarbazol. Y la última es el peróxido de hidrógeno. De esta mezcla se agregó a los portaobjetos lo suficiente para cubrir los cortes.
- Lavar con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- Finalmente los cortes fueron tratados con hematoxilina por 10 segundos, luego se deshidrató con una batería de alcoholes ascendentes y con alcohol – xilol (dipping).
- Cubrir los cortes con Hydramount.

Para los controles negativos fueron utilizados tejidos procesados de acuerdo al protocolo descrito previamente, sin embargo no fue adicionado el anticuerpo primario y solo PBS.

Inmunohistoquímica en corte histológico con Citoqueratina-5.

- La inmunohistoquímica se realizará con y sin recuperación antigénica
- Colocar los cortes seleccionados en un coupling.
- Desparafinar con una batería de xiloles descendentes y deshidratar con alcoholes descendentes, lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- Con uno de los cortes se realizará la recuperación antigénica, agregar a este PBS a 90 °C y colocar en una vaporera por 15 minutos, luego dejar el corte en reposo durante 15 minutos.
- Agregar a todos los cortes Buffer y mantener por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar el bloqueo de peroxidasa al 3% (1,5 ml de peróxido de hidrógeno más 48,5 ml de Buffer), mantener durante 30 minutos a 37°C y en agitación.
- Nuevamente agregar Buffer durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Pasar los cortes a una cámara húmeda, marcar cada uno con un lápiz hidrófobo.
- Bloqueo de sitios inespecíficos. Agregar 50 µl de Cas-Block a cada corte y dejar durante 30 minutos a 25°C. Aplicar a cada corte 50 µl de suero normal de conejo, incubar durante 20 minutos a 25°C.
- Agregar a cada corte 40 µl de anticuerpo primario, el cual es, en este caso, Citoqueratina-5 (RTU de vector), incubar durante 1 hora a 25°C.

- Traspasar los cortes al coupling y agregar Buffer, mantener durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Nuevamente colocar los cortes en la cámara húmeda y agregar 40 µl de anticuerpo secundario (anticuerpo anti-ratón hecho en conejo) 1:1000, incubar durante 1 hora a 25°C.
- Traspasar los cortes al coupling y agregar Buffer, mantener durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Revelar los cortes, para esto se utiliza un kit de revelado (Kit NovaRed Vector), el cual contiene 4 soluciones. La primera y la segunda son desconocidas. La tercera es el cromógeno, que en este caso será aminoetilcarbazol. Y la última es el peróxido de hidrógeno. De esta mezcla se agregó a los portaobjetos lo suficiente para cubrir los cortes.
- Lavar con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente los cortes fueron tratados con hematoxilina por 10 segundos, luego se deshidrató con una batería de alcoholes ascendentes y con alcohol – xilol (dipping).
- Cubrir los cortes con Hydramount.

Para los controles negativos fueron utilizados tejidos procesados de acuerdo al protocolo descrito previamente, sin embargo no fue adicionado el anticuerpo primario y solo PBS.

Capítulo 3

1. Resultados.

Protocolo N°1.

Membrana amniótica	Edad Madre	EG	Paridad	Tipo de Parto	N° Células		Observaciones
					Centrifugado 1 (C1)	Centrifugado 2 (C2)	
1	29	38+5	G4P2A1	Cesárea	0	< 500.000	Pellet escaso
2	24	39+3	PG	Cesárea	2.350.000	1.800.000	Con restos de membrana
3	19	37+5	PG	PTVCA	8.225.000	2.300.000	Se centrifuga 5 veces a 200x g 4°C. Con restos de membrana
4	21	39+3	PG	PTVCA	1.500.000	0	En C2 solo restos de membrana
5	20	40+4	PG	PTVCA	0	0	Solo restos de membrana
6	20	38+1	G2P1A0	PTVCA	0	<500.000	Pellet escaso

Tabla 2: Variables clínicas y células obtenidas en Protocolo N°1.

Para la obtención de las muestras de tejido amniótico, se recolectaron placentas de madres de una edad promedio de 22 años, con una desviación estándar de 3,76 y con una edad gestacional promedio de 39 semanas, con una desviación estándar de 0,75. El 66,6% de las muestras fue obtenido de primigestas y el 33,4% de multíparas. El 66.6% de las muestras fue obtenido de PTVCA y el 33,4 % fueron obtenidas de cesáreas.

Los resultados obtenidos del protocolo N° 1 se basaron en la extracción de 6 tejidos amnióticos, los cuales fueron centrifugados dos veces, obteniendo un promedio en el centrifugado 1 de 2.012.500 células con una desviación estándar de 3.197.567 y en centrifugado 2 de 850.000 células con una desviación estándar de 969.020. El promedio total de ambas centrifugaciones fue de 1.431.250 células.

Posterior al centrifugado, en el tejido amniótico N°5 no se obtuvo pellet celular, sólo restos de membrana disgregada. En los tejidos amnióticos N° 1 y N°6 se consiguió un pellet celular escaso, de las cuales el número de células extraídas fue menor a 500.000 células. De los tejidos amnióticos N°2, N°3 y N° 4 se logró conseguir pellet celular con restos de membrana y un conteo celular superior a 1.500.000 células. Los pellet obtenidos presentaban una gran cantidad de restos de membrana disgregada, siendo esto directamente proporcional con el número de centrifugaciones realizadas al mismo pellet.

Las células de los tejidos amnióticos N°1 y N°6 fueron sembradas en placas de cultivo pequeñas, debido al número de células obtenidas. Una parte de las células de los tejidos amnióticos N°2, N°3 y N°4 fueron sembradas en placas de cultivo grandes y otra parte en placas de cultivo pequeñas. Cualitativamente, se pudo observar que las células que fueron sembradas en placas de cultivo grandes desarrollaron una menor adhesión y crecimiento celular que las células sembradas en placas de cultivo pequeñas.

Los cultivos celulares de los tejidos amnióticos N°1, N°3, N°4, N°5 y N°6 sólo se desarrollaron como cultivo primario, ya que no sobrevivieron debido a factores externos. Los cultivos de los tejidos amnióticos N°1, N°3 y N°4 tuvieron que ser desechados ya que presentaron contaminación por hongos y los cultivos de los tejidos amnióticos N°5 y N°6 no sobrevivieron debido a una ausencia brusca de CO₂ en la estufa de cultivo. Sólo del cultivo celular del tejido amniótico N°2 se logró obtener, además del cultivo primario, un pasaje 1 y un pasaje 2 (a medida que existía un aumento del crecimiento y multiplicación celular).

Documentación fotográfica Protocolo N°1

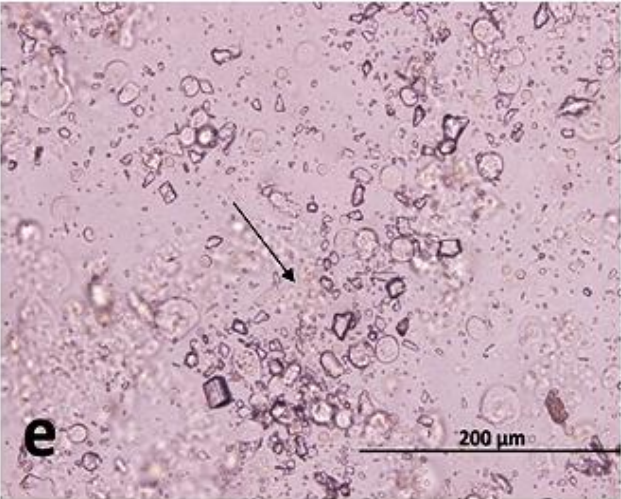
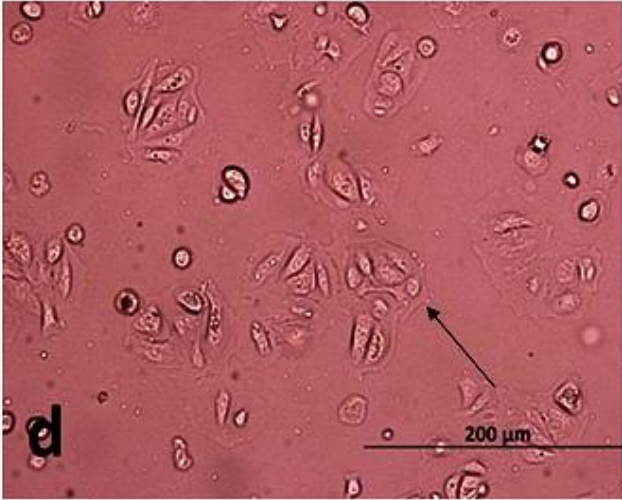
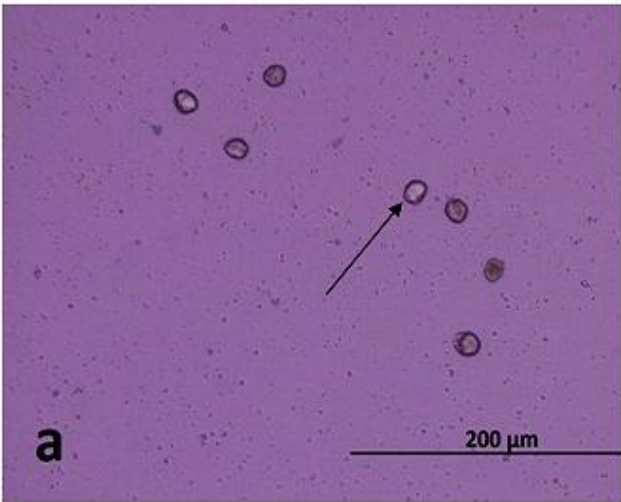


Figura a: Cultivo celular del tejido amniótico N°1, día uno, pasaje 0. Se observa células amnióticas epiteliales humanas (flecha) en escasa cantidad celular que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura b: Cultivo celular del tejido amniótico N°2, pasaje 0. Se observa células amnióticas epiteliales humanas (flecha) adheridas a la placa y restos de membrana disgregada. Aumento 40X.

Figura c: Cultivo celular del tejido amniótico N°2, pasaje 1. Se observa aumento del crecimiento y multiplicación de células amnióticas epiteliales humanas (flecha) adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura d: Cultivo celular del tejido amniótico N°2, pasaje 2. Se observa aumento del crecimiento y multiplicación de células amnióticas epiteliales humanas (flecha) adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura e: Cultivo celular del tejido amniótico N°5, pasaje 0. No se observan células amnióticas epiteliales humanas (flecha), solo presencia de membrana amniótica disgregada. Aumento 40X.

Protocolo N° 2

Membrana amniótica	Edad Madre	EG	Paridad	Tipo de Parto	N° Células		Observaciones
					Centrifugado 1	Centrifugado 2	
7	40	38+5	G3P2A0	Cesárea	2.775.000	2.500.000	
8	35	34	G2P1A0	Cesárea	0	0	No se observa pellet
9	34	37+4	G3P1A1	Cesárea	<500.000	1.750.000	C2 con escasos restos de membrana
10	28	39+2	PG	PTVCA	0	<500.000	C1 con escasos restos de membrana
11	19	38	PG	PTVCA	< 500.000	<500.000	Pellet escaso con escaso resto de membrana
12	38	38+5	G2P1A0	Cesárea	800.000	1.700.000	
13	30	40+1	G3P2A0	PTVCA	700.000	1.500.000	

Tabla 3: Variables clínicas y células obtenidas en Protocolo N°2

Para la obtención de las muestras de tejido amniótico, se recolectaron placentas de madres de una edad promedio de 32 años, con una desviación estándar de 7,29 y con una edad gestacional promedio de 38 semanas, con una desviación estándar de 2,0. El 28,58% de las muestras fue obtenido de primigestas y el 71,42% eran multíparas. El 42,86 % de las muestras fue obtenido de PTVCA y el 57,14 % fueron obtenidas de cesáreas.

Los resultados obtenidos del protocolo N° 1 se basaron en la extracción de 6 tejidos amnióticos, las cuales fueron centrifugadas dos veces, obteniendo un promedio en el centrifugado 1 de 753.521 células con una desviación estándar de 944.769 y en centrifugado 2 de 1.207.143 células con una desviación estándar de 889.957. El promedio total de ambas centrifugaciones fue de 980.357 células.

Posterior al centrifugado, en el tejido amniótico N°8 no se obtuvo pellet celular ni restos de membrana. En los tejidos amnióticos N° 10 y N°11 se consiguió un pellet celular escaso, de las cuales el número de células extraídas fue menor a 500.000 células. Del tejido amniótico N°9 se logró conseguir pellet celular con escasos restos de membrana y un conteo celular superior a 1.750.000 células. De los tejidos amnióticos N°7, N°12 y N°13 se obtuvo pellet celular sin restos de membrana y un conteo celular entre 700.000 células y 2.775.000 células. Los restos de membrana disminuyeron debido al uso de filtros de 100 µl.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo pequeñas, independiente del número de células obtenidas.

Los cultivos celulares de los tejidos amnióticos sólo se desarrollaron como cultivo primario, al observar las células identificamos que estas presentaban escasos restos de membrana amniótica disgregada y además una baja adherencia a la placa e incluso las células que se adherían se desenganchaban de la placa y finalmente el cultivo celular se perdía al ir cambiando de medio cada 48 horas.

Documentación fotográfica Protocolo N° 2

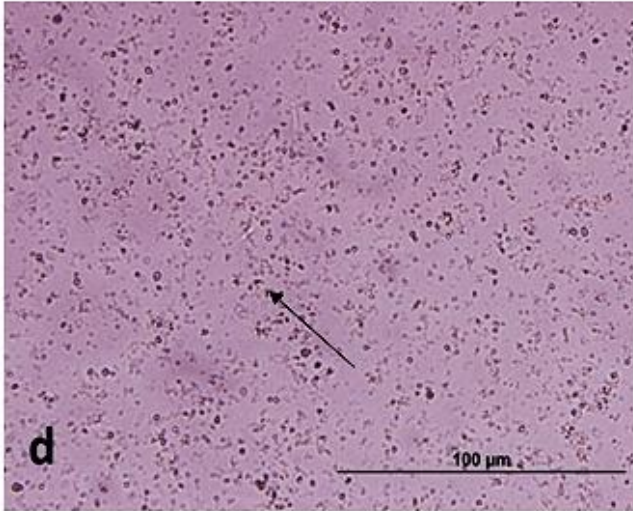
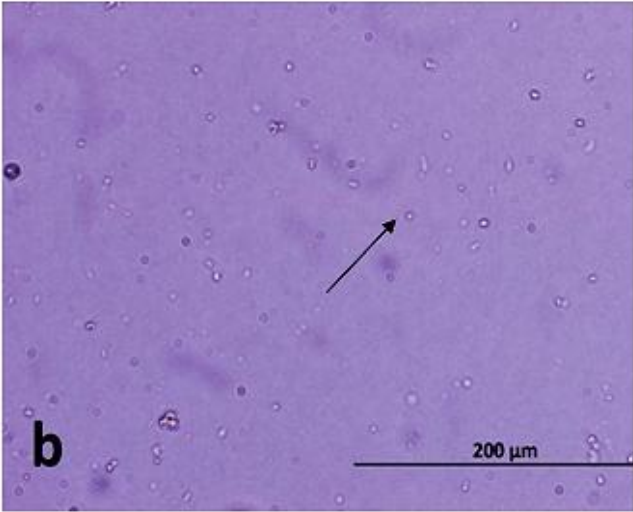
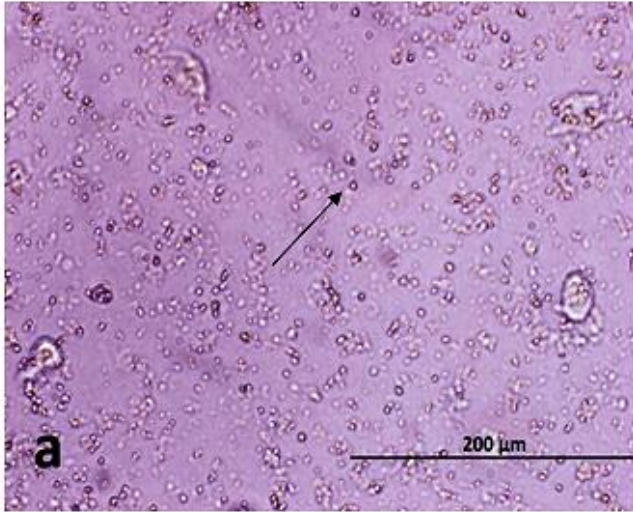


Figura a: Cultivo celular del tejido amniótico N°7, pasaje 0. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura b: Cultivo celular del tejido amniótico N°9, pasaje 0, centrifugado 1. Se observa células epiteliales amnióticas humanas (flecha) en escasa cantidad celular que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura c: Cultivo celular del tejido amniótico N°9, pasaje 0, centrifugado 2. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura d: Cultivo celular del tejido amniótico N°12, pasaje 0, centrifugado 2. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 10X.

Protocolo N° 3

Membrana amniótica	Edad Madre	EG	Paridad	Tipo de Parto	N° Células		Observaciones
					Centrifugado 1	Centrifugado 2	
14	19	38+2	PG	Cesárea	10.230.000	23.775.000	Pellet hemático
15	32	39+3	G3P2	PTVCA	2.350.000	3.775.000	Pellet hemático
16	22	37+5	PG	PTVCA	2.650.000	3.800.000	Pellet hemático
17	40	39+2	G4P2A1	Cesárea	10.000.000	20.880.000	Pellet hemático
18	25	38+4	G2P1	PTVCA	50.000	50.000	Pellet escaso
19	36	38+6	G2P1	PTVCA	100.000	50.000	Pellet escaso
20	29	39+2	G2P1	PTVCA	100.000	50.000	Pellet escaso

Tabla 4: Variables clínicas y células obtenidas en Protocolo N°3

Para la obtención de las muestras de tejido amniótico, se recolectaron placentas de madres de una edad promedio de 29 años, con una desviación estándar de 7,57 y con una edad gestacional promedio de 39 semanas, con una desviación estándar de 0,53. El 28,57% de las muestras fue obtenido de primigestas y el 71,43% eran multíparas. El 71,43% de las muestras fue obtenido de PTVCA y el 28,57 % fueron obtenidas de cesáreas.

Los resultados obtenidos del protocolo N° 3 se basaron en la extracción de 7 tejidos amnióticos, las cuales fueron centrifugadas dos veces, obteniendo un promedio en el centrifugado 1 de 3.640.000 células con una desviación estándar de 4.554.726 y en centrifugado 2 de 7.482.857 células con una desviación

estándar de 10.311.572. El promedio total de ambas centrifugaciones fue de 5.561.429 células.

Posterior al centrifugado, en los tejidos amnióticos N° 18, N°19 y N°20 se consiguió un pellet celular escaso, de las cuales el número de células extraídas fue entre 50.000 y 100.000 células por centrifugado. De los tejidos amnióticos N°14, N°15, N°16 y N° 17 se logró conseguir pellet celular el cual presentaba restos de glóbulos rojos decantados y un conteo celular entre 2.350.000 y 23.775.000 células por centrifugado. Los pellet obtenidos no presentaban restos de membrana disgregada.

Las células de los tejidos amnióticos N°14, N°15, N°16 y N° 17 fueron sembradas en placas de cultivo pequeñas y las células de los tejidos amnióticos N°18, N°19 y N°20 fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos, en las cuales cada 50.000 células era utilizado un pocillo, debido a la escasa cantidad de células extraídas.

Los cultivos celulares de los tejidos amnióticos sólo se desarrollaron como cultivo primario, al observar las células identificamos que estas no presentaban restos de membrana amniótica disgregada. Las células lograban adherirse a las placas pero no sobrevivieron debido a la ausencia de antibióticos dentro del medio de cultivo en el tejido amniótico N°14, mientras que el resto a causa de la contaminación por hongos.

Documentación fotográfica Protocolo N°3

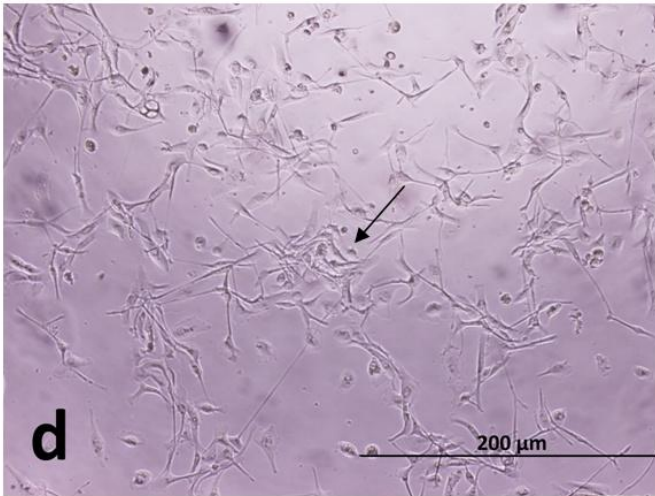
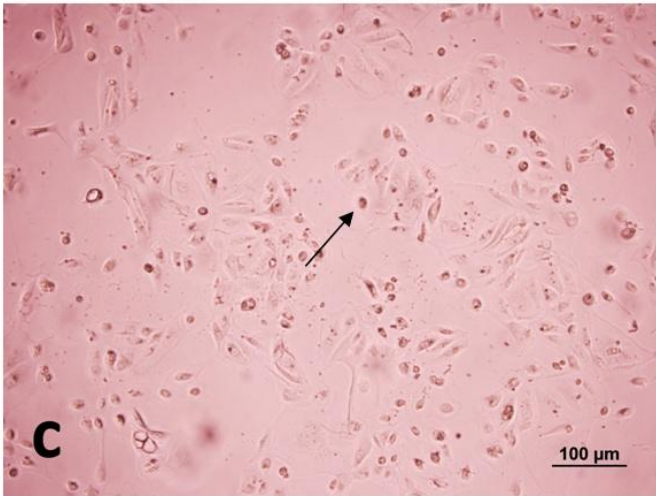
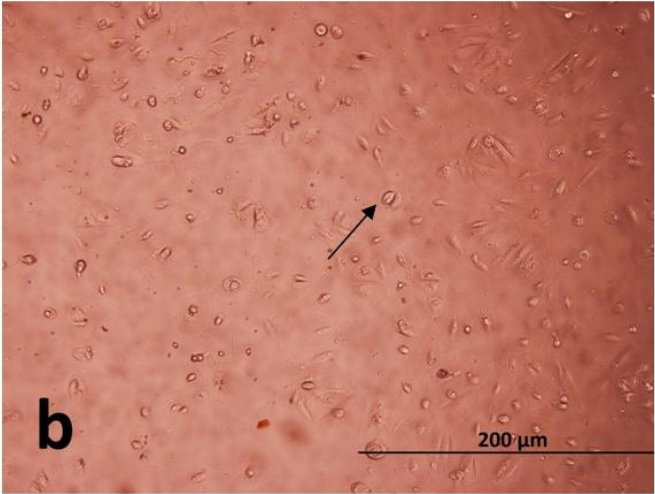
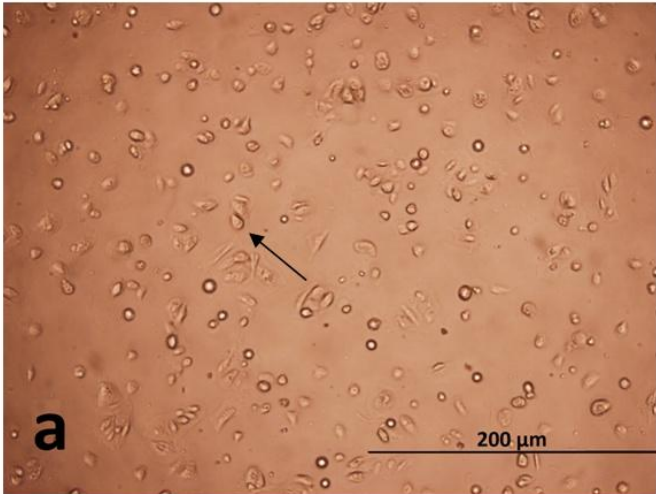


Figura a: Cultivo celular del tejido amniótico N°18, pasaje 0, centrifugado 1, en placa de 96 pocillos. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura b: Cultivo celular del tejido amniótico N°19, pasaje 0, centrifugado 1, en placa de 96 pocillos. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que no se encuentran adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura c: Cultivo celular del tejido amniótico N°17, pasaje 0, centrifugado 2.. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que presentan forma estrellada, adheridas a la placa. Aumento 40X.

Figura d: Cultivo celular del tejido amniótico N°14, pasaje 0, centrifugado 2.. Se observan células epiteliales amnióticas humanas (flecha) que presentan forma estrellada, adheridas a la placa. Aumento 40X.

Protocolo N° 4

Membrana amniótica	Edad Madre	EG	Paridad	Tipo de Parto	N° Células		Observaciones
					Centrifugado 1	Centrifugado 2	
21	20	38	PG	Cesárea	10.250.000	14.300.000	Cultivo contaminado al siguiente día.
22	35	37+3	G3P2	PTVCA	11.250.000	13.700.000	Cultivo contaminado al siguiente día.
23	23	38+5	PG	Cesárea	10.150.000	9.950.000	Cultivo contaminado al siguiente día.
24	20	37+4	PG	PTVCA	2.500.000	4.350.000	Cultivo contaminado al siguiente día.
25	19	39+1	PG	PTVCA	2.300.000	2.500.000	Meconio intra-parto. Cultivo contaminado al siguiente día.
26	30	40	G3P2	PTVCA	1.500.000	1.750.000	Cultivo contaminado al siguiente día.
27	28	39+4	G2P1	PTVCA	1.710.000	1.715.000	Cultivo contaminado al siguiente día.

Tabla 4: Variables clínicas y células obtenidas en Protocolo N°4

Para la obtención de las muestras de tejido amniótico, se recolectaron placentas de madres de una edad promedio de 25 años, con una desviación estándar de 6,11 y con una edad gestacional promedio de 38 semanas, con una desviación estándar de 1,13. Un 50% de las muestras fue obtenido de primigestas y el otro 50% fue obtenido de multíparas. El 85,71% de las muestras fue obtenido de PTVCA y el 14,28 % fueron obtenidas de cesáreas.

Los resultados obtenidos del protocolo N° 4 se basaron en la extracción de 7 tejidos amnióticos, los cuales fueron centrifugados dos veces, obteniendo un promedio en el centrifugado 1 de 5.665.714 células con una desviación estándar de 4.594.551 y en centrifugado 2 de 6.895.000 células con una desviación estándar de 5.620.966. El promedio total de ambas centrifugaciones fue de 6.280.357 células.

Posterior al centrifugado, en los tejidos amnióticos N° 26 y N°27 se obtuvieron conteos celulares entre 1.500.000 y 1.750.000 células. De los tejidos amnióticos N°21, N°22, N°23, N°24 y N° 25 se obtuvieron conteos celulares entre 2.300.000 y 14.300.000 células. Los pellet obtenidos no presentaban restos de membrana disgregada.

Las células de los tejidos amnióticos N°21, N°22, N°23 y N° 24 fueron sembradas en placas de cultivo pequeñas y las células de los tejidos amnióticos N°25, N°26 y N°27 fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos, sobre un portaobjetos, preparando dichas células para la realización de una inmunohistoquímica en cultivo celular.

Al observar las células identificamos que estas no presentaban restos de membrana amniótica disgregada. Los cultivos celulares no tuvieron viabilidad, ya que todos se encontraron contaminados al día siguiente de haber sido sembrados, por lo que las células no lograban adherirse a las placas y debieron ser eliminados para evitar nuevos brotes de contaminación en la sala de cultivo.

No se obtienen fotografías de los cultivos celulares del Protocolo N°4 debido a que estos estaban contaminados.

Corte histológico de amnios post-tripzinación.

En el corte histológico de amnios post-tripzinación (2,25 horas) del protocolo N°3, se observan restos de células epiteliales, la capa mesenquimática y las redes fibrosas. En el corte histológico de amnios post-tripzinación (2,25 horas) del protocolo N°4, sólo se observa la capa mesenquimática y las redes fibrosas de la membrana amniótica

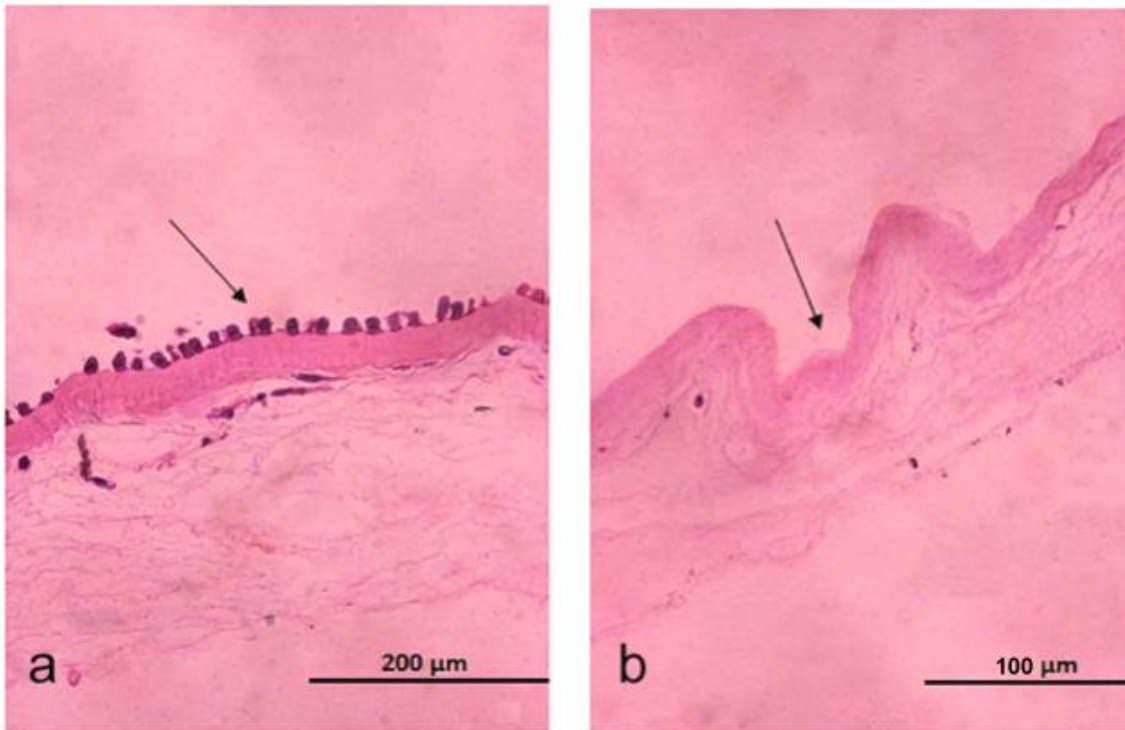


Figura a: Zona del corte histológico de amnios post-tripzinación del protocolo N°3 que presenta células epiteliales levemente ancladas a la membrana basal. Aumento 40X.

Figura b: Zona del corte histológico de amnios post-tripzinación del protocolo N°3 donde no se observan células epiteliales ancladas a la membrana basal. Aumento 10X.



Figura c: Corte histológico de amnios post-tripzinación del protocolo N°4 donde no se observan células epiteliales ancladas a la membrana basa. Aumento 10X.

Caracterización Morfológica

Caracterización morfológica en cultivo celular de amnios.

En el cultivo se observan células que presentan una morfología epiteliode, de forma estrellada, ovalada y cúbicas, El núcleo presenta forma redondeada, éste no siempre se encuentra ubicado al centro de la célula. Las células del cultivo se encuentran formando agrupaciones.

Caracterización morfológica en corte histológico de amnios

En el corte histológico de amnios se observa una capa epitelial, una capa fibrosa y una capa mesénquimática. La capa superior presenta una estructura epitelial cuboídea simple, las células contienen un solo núcleo ubicado en la zona central. En el corte también se observa la membrana basal, ubicada entre la capa epitelial y la capa mesenquimática. Bajo la membrana basal se observa la capa compacta, la cual presenta estructura fibrosa. A nivel de la capa de fibroblastos se observan células alargadas, las que presentan un núcleo de forma irregular, además presenta una abundante red fibrosa. Finalmente se encuentra la capa esponjosa, la cual también presenta una red fibrosa, pero menos densa que las capas anteriores.

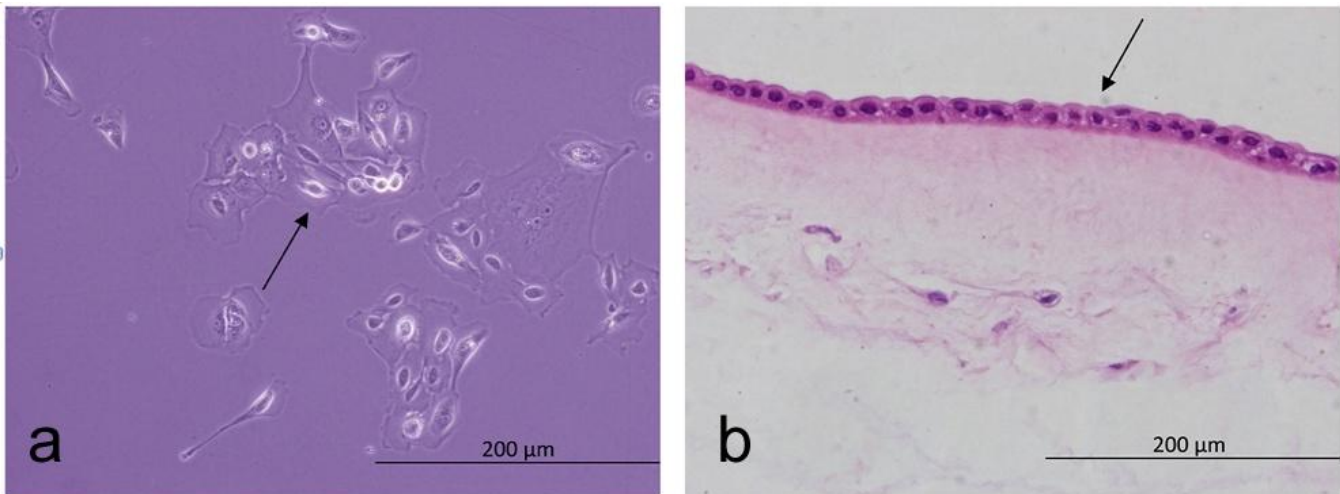


Figura a: Cultivo celular obtenido de amnios humano. Aumento 40X.

Figura b: Corte histológico de amnios humano. Aumento 40X.

Caracterización Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios.

Anticuerpo:	Citoqueratina-5		Vicentina	
Capa celular:	Epitelio	Mesénquima	Epitelio	Mesénquima
Resultado:	Positivo	Negativo	Negativo	Positividad débil

Tabla 5: Resumen de resultados obtenidos en inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios.

Al realizar la inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios se observa que la Citoqueratina-5 marca en color cobrizo las células del epitelio amniótico en más de un 50%, siendo el resultado positivo y no marca células mesenquimales, siendo el resultado negativo. Al utilizar Vimentina se observa que marca en un color cobrizo menos del 50% del epitelio, siendo el resultado negativo y el 50% del mesenquima, siendo el resultado de positividad débil.

Documentación fotográfica Inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios

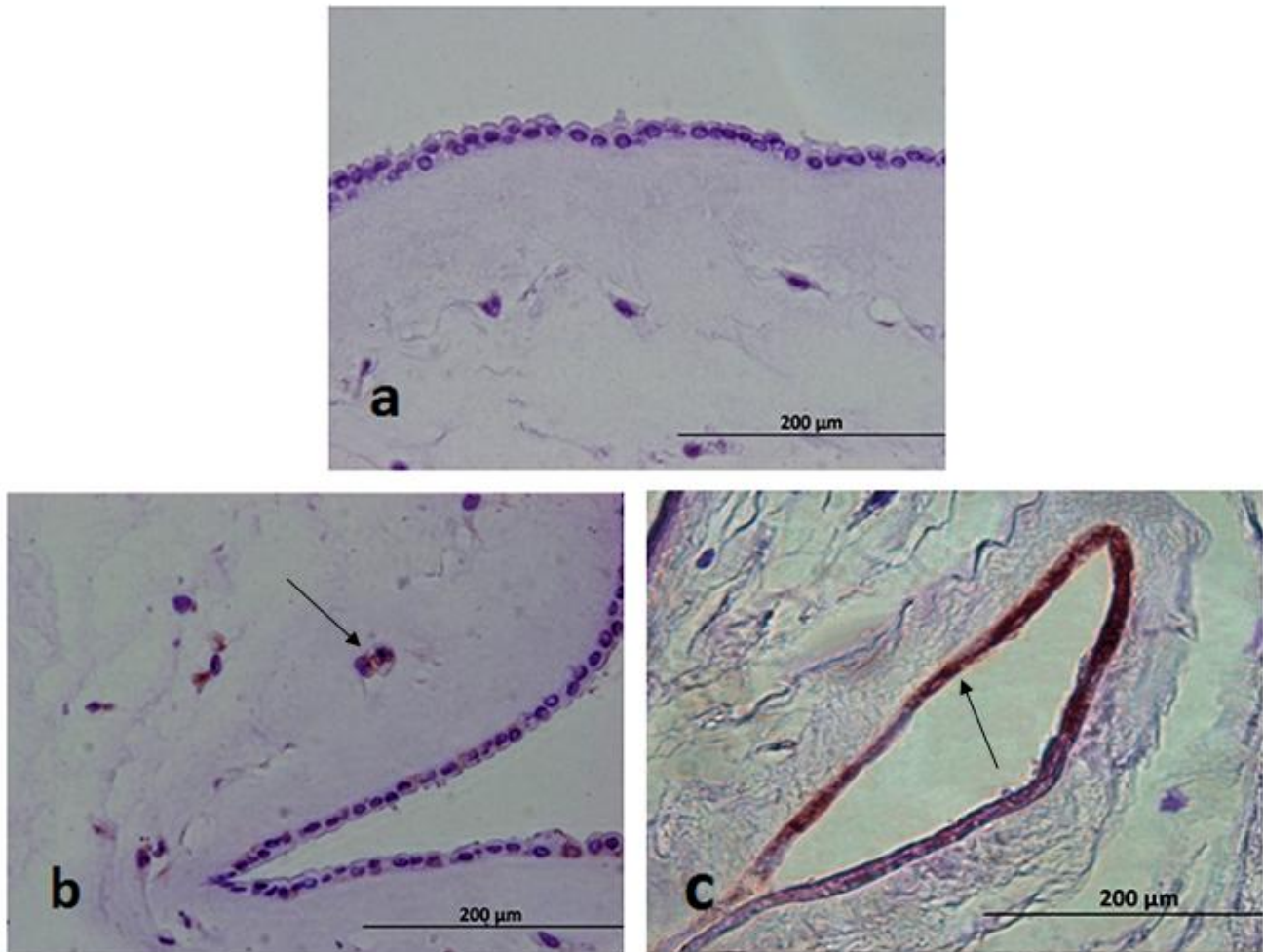


Figura a: Corte histológico de amnios con inmunohistoquímica, control (-).Aumento 40X.

Figura b: Corte histológico de amnios con inmunohistoquímica, con positividad débil para vimentina en mesénquima. Aumento 40X.

Figura c: Corte histológico de amnios con inmunohistoquímica, positivo para Citoqueratina-5 en epitelio. Aumento 40X.

Capitulo 4

1. Discusión

Protocolos de obtención de células epiteliales a partir de membrana amniótica humana.

A lo largo del estudio se obtuvieron diferentes cantidades de células, estos datos iban variando a medida que se experimentaba y se modificó dicho protocolo.

En el protocolo N°1 se obtuvo un promedio de 1.431.250 células, en el protocolo N°2 se obtuvo un promedio de 980.357 células, en el protocolo N°3 se obtuvo un promedio de 5.561.429 células y en el protocolo N°4 se obtuvo un promedio de 6.280.357.

En el cuarto protocolo se obtuvo la mayor cantidad de células, debido a las modificaciones que se realizaron al primer, segundo y tercer protocolo, estas modificaciones se dieron a partir de las siguientes razones:

En el protocolo N°1 se obtuvieron cultivos celulares con restos de membrana, por lo cual en el protocolo N°2 se agregó la utilización de filtros de 100 µm, con esto logramos disminuir notablemente la cantidad de restos de membrana en los pellet y cultivos celulares, pero aún así en algunos cultivos persistían estos restos, por lo cual en el protocolo N°3 se eliminó la compresión de la membrana con los dedos al momento de traspasar la membrana del digerido de tripsina al siguiente paso, finalmente en este protocolo no se observaron restos de membrana.

A pesar de haber obtenido los conteos celulares más altos en el protocolo N°3, también se obtuvieron conteos celulares menores a 100.000, por lo que se realizó un corte histológico con tinción hematoxilina-eosina a una membrana amniótica post-tripzización del protocolo N°3, donde se pudo observar que habían zonas de la membrana que aún presentaban células epiteliales ancladas a la membrana basal y zonas que no la presentaban, por lo que se realizó el protocolo N°4, donde

la membrana amniótica fue seccionada en trozos de 2cm x 2cm y distribuida en más tubos de centrifuga con tripsina, de manera que estuviese más expuesta a la tripsina.

En el protocolo N°1, centrifugando a 200 rpm, no se obtuvo un conteo celular superior a 4.150.000 células, a excepción del amnios N°3, en el cual se centrifugó 5 veces a 200 rpm y se obtuvo 10.525.000 células, es por esto que en protocolo N°2 se aumentó las revoluciones a 300 rpm, sin obtener resultados favorables, por lo cual en el protocolo N°3 se aumentaron las revoluciones a 1000 rpm, obteniendo pellet cualitativamente mayores pero con presencia de restos sanguíneos, por lo que en el protocolo N°4 se mantuvo la centrifugación a 1000 rpm, pero se cambió el filtro de 100µm a 75µm, obteniendo como resultado conteos celulares superiores a 1.500.000 células y sin restos hemáticos. En el protocolo N°1 y N°2 las centrifugaciones fueron realizadas a 4°C y el protocolo N°3 y N°4 a temperatura ambiente, estos cambios en la temperatura no afectaron en la cantidad de pellet celular ni en la sobrevivencia de estas células.

Dentro de los protocolos N°1 y N°2, se utilizó tampón de pre digestión, con la finalidad de preparar el tejido para la tripsinización de la membrana amniótica y en el protocolo N°3 y N°4 no se realizó este paso, si no que se reemplazó por una incubación de la membrana amniótica en tripsina por 15 minutos; al ser la tripsina una enzima que rompe las uniones celulares de mejor manera que el tampón de pre digestión, esta aísla una mayor cantidad de células amnióticas epiteliales. Asimismo en el protocolo N°2, N°3 y N°4, se realizaron las incubaciones en agitación para aumentar la superficie de contacto de la membrana con la solución, lo cual permitió una mayor acción de las soluciones.

En el protocolo N°3 y N°4, ambas tripsinizaciones se aumentaron de 40 minutos (protocolo N°1 y N°2) a 60 minutos, de manera de incrementar el tiempo de contacto de la membrana amniótica con la solución y permitir una mejor extracción celular.

Durante la investigación en cada protocolo se utilizó un medio de cultivo diferente, para evaluar su eficacia en la mantención y crecimiento de los cultivos celulares.

En el protocolo N°1 se utilizó un medio de cultivo estándar (Hyclone DMEN/HIGH glucose 1000 ml más suero fetal bovino, amphotericina B 250 µg/ml, penicilina 10.000 µg/ml), con el cual las células se adherían a la placa pero tenían un crecimiento lento. En el protocolo N°2 se utilizó el medio de cultivo estándar más 2 mercaptoethanol y a cada placa se le agregó EGF (factor de crecimiento epitelial), con esta nueva solución se observó una baja adherencia a la placa, de la cual con el tiempo las células se desprendían. Luego en el protocolo N°3 se utilizó medio de cultivo Epilife Mepi 500 CA 500ml más suplemento S7 100X 5ml amphotericina B 250 µg/ml y penicilina 10.000 µg/ml, con este medio se observó una mejor adherencia y crecimiento celular. En el protocolo N°4 se utilizó el mismo medio de cultivo que en el protocolo N°3, pero al observar que en este último protocolo todos los cultivos celulares se encontraban contaminados y ante la sospecha de que el factor de contaminación podría ser dicho medio de cultivo, en el amnios N°26 y N°27 las células obtenidas fueron sembradas con medio de cultivo estándar más suplemento S7 100X 5ml, aún así los cultivos celulares se encontraron contaminados al día siguiente de haber sido sembrados, por lo que el medio de cultivo fue descartado como fuente de contaminación.

Corte histológico de amnios post-tripzinación.

Las células que en este estudio se intentan aislar presentan características típicas de los epitelios, se organizan en capas celulares que se enlazan estrechamente mediante estructuras especializadas asociadas a la membrana, como las uniones estrechas, uniones de anclaje (desmosomas en cinturón, puntuales y hemidesmosomas) y uniones en hendidura (Kirszenbaum. A L 2008)

Para romper las uniones que forman el epitelio amniótico, es necesaria la utilización de una enzima llamada tripsina.

Al analizar los resultados de los protocolos N°1, N°2 y N°3 no se obtuvieron los conteos celulares esperados, por lo cual, con una membrana del protocolo N°3 se realizó un corte histológico post-tripsinización, en el cual logramos observar la presencia de zonas con células epiteliales adheridas a la lámina basal.

La persistencia de células epiteliales se relaciona con la superficie de contacto de la membrana con la tripsina, ya que en los protocolos anteriores la membrana se encontraba plegada en el frasco con la solución, lo que no permitía su completa exposición.

En el protocolo N°4 la membrana fue seccionada en trozos de 2cm x 2cm y fue distribuida en una mayor cantidad de tubos de centrifuga con tripsina, de esta forma la membrana tuvo mayor cantidad de zonas expuestas a la tripsina. En el corte histológico de amnios post-tripsinización del protocolo N°4 se observaron escasas zonas con células epiteliales ancladas a la membrana basal, y una mayor cantidad de zonas que no presentaban células epiteliales ancladas a la membrana basal del amnios.

Caracterización Morfológica

Caracterización morfológica en corte histológico de amnios:

Se evidenció en los cortes histológicos de amnios con tinción hematoxilina-eosina que la morfología celular observada es homologable a la descrita en la literatura, ya que a microscopía directa se diferencian las 5 capas estructurales del tejido amniótico (capa epitelial, basal, compacta, fibroblasto y esponjosa), así mismo en cada capa se distinguen sus componentes celulares y fibrosos.

Es importante destacar que mediante estos cortes podemos comprobar que en el protocolo de extracción de amnios sólo es extraído tejido amniótico y no tejido coriónico.

Caracterización morfológica en cultivo celular de amnios.

Comparando con revisiones bibliográficas las células en cultivo no presentan una morfología específica, ya que tienden a extender su citoplasma en la placa donde se encuentran, intentando abarcar la mayor área posible, de manera de adherirse a esta. Estas células forman agrupaciones, lo cual es una característica típica de las células epiteliales.

Por lo tanto, según lo observado, las células cultivadas tienen una morfología que corresponde a células epiteliales amnióticas humanas.

Caracterización Inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica en cortes histológicos de amnios.

La inmunohistoquímica de este estudio fue realizada con Citoqueratina-5 y con Vimentina, los cuales son marcadores de filamentos intermedios del citoesqueleto.

Las células del amnios presentan una estructura celular diferente, en epitelio podemos encontrar células con filamentos intermedios tipo 1 y tipo 2, mientras que en mesénquima sólo presentan filamentos intermedios tipo 3 (Kirszenbaum. A L 2008).

Filamento intermedio tipo1 (queratinas ácidas) y tipo 2 (queratinas neutras o básicas): esta clase de proteínas forman el citoesqueleto de filamentos intermedios de las células epiteliales denominadas citoqueratinas. Una cantidad igual de citoqueratinas ácidas y neutras-básicas se combinan para formar este tipo de proteínas del filamento intermedio (Kirszenbaum. A L 2008).

Filamento intermedio tipo 3: este tipo de filamento incluye la proteína vimentina, que suele encontrarse en células de origen mesenquimal. En algunas células la vimentina forma un vínculo estructural entre la membrana plasmática y la lámina nuclear (Kirszenbaum. A L 2008).

En la inmunohistoquímica realizada se comprobó que las células del corte histológico de amnios presentan una capa epitelial, puesto que estas células, luego de realizar la técnica, dio resultado positivo para Citoqueratina-5. Se utilizó Citoqueratina-5, ya que este es un marcador específico para epitelio amniótico.

Al utilizar Vimentina, dio como resultado positividad débil, ya que se marcó el 50% de las células blanco, por lo tanto se pudo comprobar que el amnios extraído tiene una capa de mesénquima.

2. Conclusiones y sugerencias

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que ha surgido como una nueva disciplina médica y como se ha mencionado anteriormente, para este fin, se ha comenzado a utilizar la membrana amniótica, ya sea de manera íntegra, en trasplantes de membrana amniótica, como también parcial, extrayendo sus células epiteliales y utilizándolas en el tratamiento de un gran número de patologías. Sin embargo la protocolización de su uso aún se encuentra en desarrollo.

La importancia fundamental de este estudio, y su objetivo principal, es la determinación del tipo de protocolo adecuado para permitir la utilidad de la membrana amniótica como fuente de células epiteliales útiles en el desarrollo de un tratamiento de terapia celular. Gracias a lo estudiado durante esta tesis se concluyó que lo esencial en el trabajo con estas células es mantener un buen manejo estéril y meticulosidad en la técnica de extracción, ya que se trata de un tipo de cultivo celular muy lábil. Aun así, la membrana amniótica es un tejido abundante y de fácil obtención, debido a que se desecha luego de ocurrido el parto y no posee barreras éticas y legales que nos impida su utilización, por lo que representa un valioso material que puede ser utilizado en medicina regenerativa y por ende, un gran paso para la ciencia y para lo que en el futuro la medicina moderna nos podría ofrecer.

Durante todo el desarrollo de la tesis fue necesario realizar diversos cambios a los protocolos para facilitar una mejor y mayor extracción de células epiteliales amnióticas humanas, lo cual permitió determinar un protocolo final, que corresponde al protocolo N° 4, apto para ser manejado en futuras extracciones, debido a que proporcionó satisfactoriamente la obtención de células epiteliales a pesar de que no se pudo mantener los cultivos in vitro por factores externos al protocolo.

Es de suma importancia sugerir que a través de este protocolo de extracción de células epiteliales derivadas de amnios pueden nacer nuevas ideas que completan este trabajo. Dentro de los futuros estudios que podrían ser realizados se sugiere la búsqueda de un medio de cultivo que permita el rápido crecimiento y adherencia de las células a las placas de cultivo, estudiar la viabilidad celular, diferenciación celular en las diversas líneas para ser implantadas en los tejidos del cuerpo de animales para su posterior utilización en humanos, entre otros.

Bibliografía

- ✓ **Albert B, B. D., Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (2004).** Biología Molecular de la Célula, Panamericana.
- ✓ **Arias. M, R. F. (2009).** "Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina." Arch Med Vet 41: 185 - 195.
- ✓ **Aznar. J, L. (2008).** "Alternativas para la obtención de células madre similares a las embrionarias sin tener que destruir a los embriones de los que se obtienen." Observatorio de Bioética de la UCV.
- ✓ **Bourne G. (1962).** "The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function." Postgrad Med J 38: 193-201.
- ✓ **Carlson B. (2005).** Embriología Humana y Biología del Desarrollo. Madrid, ELSEVIER.
- ✓ **Carmen L. Insausti, M. B., Patricia Bleda, Paqui Iniesta, Maria J. Majado, Gregorio Castellanos and Jose M. Moraleda (2010).** "The amniotic membrane as a source of stem cells." Histol Histopathol 25: 91-98.
- ✓ **CordbloodbankChile.** "Banco de células madres." from <http://www.cordbloodbankchile.cl/>.
- ✓ **CordonVital.** "Preservación de células madre." from <http://www.cordonvital.com/Index.html>.
- ✓ **Cornejo R., U. P. (2010).** "Morfometría del nucleolo en la diferenciación celular del epitelio mamario." Revista Chilena Obstetricia y Ginecología 2: 107-111.
- ✓ **Costa J. (2005).** "Ética de la vida y de la salud." (Cuestiones de Bioética): 59.
- ✓ **CryoCell.** "Banco de células madre." from <http://www.cryo-cell.cl/>.
- ✓ **Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006).** "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy 8(4): 315-317.

- ✓ **Elwan, M. A. and N. Sakuragawa (1997).** "Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells." Neuroreport 8(16): 3435-3438.
- ✓ **Gobierno de Chile (2010).** Codigo sanitario, Editorial juridica de Chile.
- ✓ **Han SK, T. T., Lee DG et al. (2005).** "Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro." Ann Plast Surg 55: 414–419.
- ✓ **Hernández P, D. E. (2004).** "Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas, Instituto de Hematología e Inmunología." Revista Cubana Hematología
- ✓ **Ilancheran S., M. Y., Manuelpillai U. (2009).** "Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?" Placenta 30(1): 2-10.
- ✓ **In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2004).** "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta." Stem Cells 22(7): 1338-1345.
- ✓ **INE (2009).** "Estadísticas vitales, Informe anual."
- ✓ **Int´Anker P., S. S., Kleijburg-van der Keur C., Groot-Swings G., Claas F., Fibb W. and Kanhai H. (2004).** "Isolation of Mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta." Stem Cells 22: 1338-1345.
- ✓ **Kakishita, K., M. A. Elwan, et al. (2000).** "Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy." Exp Neurol 165(1): 27-34.
- ✓ **Kirszenbaum. A L (2008).** "Histología y biología celular." Elsevier 2ª edición.
- ✓ **Langman T.W. (2004).** Embriologia Medica, Mdica Panamericana.
- ✓ **Madhira, S. L., G. Vemuganti, et al. (2008).** "Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction." Mol Vis 14: 189-196.
- ✓ **Mihu, C. M., S. Susman, et al. (2009).** "Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis." Rom J Morphol Embryol 50(4): 549-557.

- ✓ **Miki, T., T. Lehmann, et al. (2005).** "Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells." Stem Cells 23(10): 1549-1559.
- ✓ **Miki, T. and S. C. Strom (2006).** "Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells." Stem Cell Rev 2(2): 133-142.
- ✓ **Moore T., K. L. (2004).** Embriología Clínica, Elsevier.
- ✓ **Niknejad, H., H. Peirovi, et al. (2008).** "Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering." Eur Cell Mater 15: 88-99.
- ✓ **Nombela. C, B. C. (2002).** "Informe sobre la investigación con células troncales "Comité Asesor de Ética en la Investigación Científica y Tecnológica"."
- ✓ **Parolini, O., F. Alviano, et al. (2008).** "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): 300-311.
- ✓ **Payne, W. G., T. L. Wachtel, et al. (2010).** "Effect of amnion-derived cellular cytokine solution on healing of experimental partial-thickness burns." World J Surg 34(7): 1663-1668.
- ✓ **Pérez A, D. E., Ed. (2005).** Obstetricia, Mediterráneo.
- ✓ **Pittenger M.F., M., A.M., Beck, S.C., et al. (1999).** "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science: 143-147.
- ✓ **Portmann-Lanz, C. B., A. Schoeberlein, et al. (2006).** "Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration." Am J Obstet Gynecol 194(3): 664-673.
- ✓ **Rivera Z, R. e. a. (2004).** "Fisiopatología de la rotura prematura de las membranas ovulares en embarazos de pretérmino." Rev. chil. obstet. ginecol 69: 250.
- ✓ **Rodríguez-Pardo, V. M. (2011).** "Células Madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación." Revista de la Facultad de Ciencias "Pontificia Universidad Javeriana" 10.

- ✓ **Sakuragawa, N., S. Enosawa, et al. (2000).** "Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver." J Hum Genet 45(3): 171-176.
- ✓ **Sakuragawa, N., K. Kakinuma, et al. (2004).** "Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells." J Neurosci Res 78(2): 208-214.
- ✓ **Shinya, M., H. Komuro, et al. (2010).** "Neural differentiation potential of rat amniotic epithelial cells." Fetal Pediatr Pathol 29(3): 133-143.
- ✓ **Steed DL, T. C., Duffy D et al (2008).** "Amnion-derived cellular cytokine solution: a physiological combination of cytokines for wound healing." ePlasty 8: 157–165.
- ✓ **Steigman, S. A. and D. O. Fauza (2007).** "Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta." Curr Protoc Stem Cell Biol 1: Unit 1E 2.
- ✓ **Takashima, S., H. Ise, et al. (2004).** "Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions." Cell Struct Funct 29(3): 73-84.
- ✓ **Tamagawa, T., S. Oi, et al. (2007).** "Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro." Hum Cell 20(3): 77-84.
- ✓ **Vidacel.** "Banco de células madre." from <http://www.vidacel.cl/sitio/>.
- ✓ **Wagner S, J. B. (2008).** "Investigación con células madre: ¿crimen o cura?" perspectiva 16(temas & debates).
- ✓ **Wei, J. P., M. Nawata, et al. (2009).** "Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes." Cloning Stem Cells 11(1): 19-26.
- ✓ **Worster A. (2001).** "Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix." J Orthop Res: 738-749.
- ✓ **Xing L, F. M., Marcelo CL et al . (2007).** "Amnion-derived multipotent progenitor cells increase gain of incisional breaking strength and decrease incidence and severity of acute wound failure. ." J Burns Wounds 7: 39–52.

- ✓ **Yu, S. J., M. Soncini, et al. (2009).** "Amnion: a potent graft source for cell therapy in stroke." Cell Transplant 18(2): 111-118.
- ✓ **Zhao, P., H. Ise, et al. (2005).** "Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes." Transplantation 79(5): 528-535.

ANEXOS

ANEXO A: Protocolo de fijación de Methacarn para corte histológico de amnios humano.

Methacarn:	8 horas
Alcohol 100% n°1:	40 minutos
Alcohol 100% n°2:	40 minutos
Alcohol 100% n°3:	40 minutos
Xilol n°1:	15 minutos
Xilol n°2:	15 minutos
Xilol n°3:	15 minutos
Parafina n°1 a 60°C:	30 minutos
Parafina n°2 a 60°C:	30 minutos
Parafina n°3 a 60°C:	30 minutos

ANEXO B: Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina

Desparafinación:

Xilol nº1:	5 minutos
Xilol nº2:	5 minutos
Xilol nº3:	5 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% nº1:	3 minutos
Alcohol 100% nº2:	3 minutos
Alcohol 96%:	3 minutos
Alcohol 70%:	3 minutos
Agua destilada:	5 minutos
	10 segundos

Coloración con hematoxilina de Mayer:

Viraje en agua corriente:	5 minutos
Alcohol 95%	2 minutos

Coloración con Eosina Alcohólica 0,5%:

1 segundo

Deshidratación:

Alcohol 100% nº1:	2 minutos
Alcohol 100% nº2:	2 minutos

Montaje:

Xilol nº1:	2 minutos
Xilol nº2:	2 minutos
Xilol nº3:	2 minutos

ANEXO C: Protocolos de Inmunohistoquímica en cortes histológicos (Vimentina, Citoqueratina-5 y Control negativo)

Protocolo para Inmunohistoquímica en corte histológico con Vimentina:

Desparafinación:

Xilol nº1:	10 minutos
Xilol nº2:	10 minutos
Xilol nº3:	10 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% nº1:	10 minutos
Alcohol 100% nº2:	10 minutos
Alcohol 96%:	10 minutos
Alcohol 70%:	10 minutos
Agua destilada x 3 veces:	5 minutos

Bloqueo peroxidasa endógena :

Peroxidasa al 3% 1,5 ml + PBS 48,5 ml a 37 °C:	30 minutos
PBS 1X x 3 veces:	5 minutos

Bloqueo de sitios inespecíficos:

CAS Block 50 µl a 25 °C:	30 minutos
--------------------------	------------

Bloqueo suero normal:

Suero normal de cabra 50 µl a 25°C	20 minutos
------------------------------------	------------

Incubación Anticuerpo primario:

Vimentina (RTU de vector) 40 µl a 4 °C:	12 horas
PBS 1X x 3 veces:	5 minutos

Incubación Anticuerpo secundario:

PBS 1X 499 μ l + Ac secundario anti-conejo HRP hecho 1 hora
en cubra 1 μ l a 25 °C:

Revelación Peroxidasa:

Kit de revelado (Kit NovaRed Vector): Máximo 5 minutos
Agua destilada: 5 minutos

Contraste coloración Hematoxilina:

Hematoxilina: 10 segundos

Deshidratación:

Alcohol 70%: 2 segundos
Alcohol 96%: 2 segundos
Alcohol 100% n°1: 2 segundos
Alcohol 100% n°2: 2 segundos
Alcohol/xilol: 2 segundos

Montaje:

Xilol n°1: 5 minutos
Xilol n°2: 5 minutos
Xilol n°3: 5 minutos

Protocolo para Inmunohistoquímica en corte histológico con Citoqueratina-5

Desparafinación:

Xilol nº1	10 minutos
Xilol nº2	10 minutos
Xilol nº3	10 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% nº1	10 minutos
Alcohol 100% nº2	10 minutos
Alcohol 96%	10 minutos
Alcohol 70%	10 minutos
Agua destilada x 3 veces	5 minutos

Bloqueo peroxidasa endógena :

Peroxidasa al 3% 1,5 ml + PBS 48,5 ml a 37°C	30 minutos
Buffer	15 minutos

Bloqueo de sitios inespecíficos:

CAS Block 50 µl a 25 °C:	30 minutos
--------------------------	------------

Bloqueo suero normal:

Suero normal de conejo 50 µl a 25°C:	20 minutos
--------------------------------------	------------

Incubación Anticuerpo primario:

Citoqueratina-5 (RTU de vector) 40 µl a 25°C	1 hora
Buffer	15 minutos

Incubación Anticuerpo secundario:

PBS 1X 999 µl + Ac secundario anti-ratón HRP hecho en conejo 1 µl a 25 °C:	1 hora
---	--------

Revelación Peroxidasa:

Kit de revelado (Kit NovaRed Vector):	Máximo 5 minutos
Agua destilada:	5 minutos

Contraste coloración Hematoxilina:

Hematoxilina:	10 segundos
---------------	-------------

Deshidratación:

Alcohol 70%:	3 segundos
Alcohol 96%:	3 segundos
Alcohol 100% nº1:	3 segundos
Alcohol 100% nº2:	3 segundos
Alcohol/xilol:	3 segundos

Montaje:

Xilol nº1:	6 minutos
Xilol nº2:	6 minutos
Xilol nº3:	5 minutos

Protocolo para Inmunohistoquímica en corte histológico con Control (-)

Desparafinación:

Xilol nº1:	10 minutos
Xilol nº2:	10 minutos
Xilol nº3:	10 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% nº1:	10 minutos
Alcohol 100% nº2:	10 minutos
Alcohol 96%:	10 minutos
Alcohol 70%:	10 minutos
Agua destilada x 3 veces:	5 minutos

Bloqueo peroxidasa endógena :

Peroxidasa al 3% 1,5 ml + PBS 48,5 ml a 37 °C:	30 minutos
PBS 1X x 3 veces:	5 minutos

Bloqueo de sitios inespecíficos:

CAS Block 50 µl a 25 °C:	30 minutos
--------------------------	------------

Incubación nº1:

CAS Block 50 µl:	12 horas
PBS 1X x 3 veces:	5 minutos

Incubación nº2:

Polímero marcado a 25 °C:	1 hora
---------------------------	--------

Revelación Peroxidasa:

Kit de revelado:	Máximo 5 minutos
Agua destilada:	5 minutos

Contraste coloración Hematoxilina:

Hematoxilina: 10 minutos

Deshidratación:

Alcohol 70%: 4 segundos

Alcohol 96%: 4 segundos

Alcohol 100% n°1: 4 segundos

Alcohol 100% n°2: 4 segundos

Alcohol/xilol: 4 segundos

Montaje:

Xilol n°1: 7 minutos

Xilol n°2: 7 minutos

Xilol n°3: 5 minutos

ANEXO D: Protocolos para preparación de soluciones.

Preparación Buffer de transporte:

HBSS Hy Clone:	1 Lt.
Amphotericina B:	10 ml.
Penicilina:	10 ml.

Preparación Buffer de Pre-digestión:

HBSS Hy Clone:	1 Lt.
ETHyleneglycol-bis	190 mg.

Preparación Tripsina al 1X:

HBSS Hy Clone:	500 ml
Tripsina al 10X	5 ml.

Preparación Medio de cultivo estándar Protocolo 1

Hyclone DMEN/HIGH glucose	1000ml.
Suero fetal bovino	250 µg/ml.
Amphotericina B	250 µg/ml.
Penicilina	10.000 µg/ml.

Preparación Medio de cultivo estándar Protocolo 2

Hyclone DMEN/HIGH glucose	1000ml.
Suero fetal bovino	250 µg/ml.
Amphotericina B	250 µg/ml.
Penicilina	10.000 µg/ml.
2 mercaptoethanol	1 µl.

Preparación Medio de cultivo estándar Protocolo 3 y 4

Epilife Mepi 500 CA	500ml
Suplemento S7 100X	5ml
Amphotericina B	250 µg/ml
Penicilina	10.000 µg/ml

ANEXO E: Extracto Código Sanitario.

Biblioteca del Congreso Nacional

- Identificación de la Norma : DFL-725; DTO-725
- Fecha de Publicación : 31.01.1968
- Fecha de Promulgación : 11.12.1967
- Organismo : MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
- Última Modificación : LEY-20029 13.07.2005

CODIGO SANITARIO RECTIFICACION

DECRETO CON FUERZA DE LEY N° 725 D.O. 06.02.1968

Núm. 725.- Santiago, 11 de diciembre de 1967.-

Visto: lo dispuesto en el artículo 14 de la Ley N°16.585,

Decreto:

Modifícase el decreto con fuerza de ley N° 226, de 15 de mayo de 1931, que aprobó el Código Sanitario, en la forma que aparece en el presente texto:

LIBRO NOVENO (ARTS. 145-154)

DEL APROVECHAMIENTO DE TEJIDOS O PARTES DEL CUERPO DE UN DONANTE VIVO Y DE LA UTILIZACION DE CADAVERES, O PARTE DE ELLOS, CON FINES CIENTIFICOS O TERAPEUTICOS.

Art. 145. El aprovechamiento de tejidos o partes del cuerpo de un donante vivo, para su injerto en otra persona, sólo se permitirá cuando fuere a título gratuito y con fines terapéuticos.

Art. 152. Será nulo y sin ningún valor el acto o contrato que, a título oneroso, contenga la promesa o entrega de un tejido o parte del cuerpo humano para efectuar un injerto.

Art. 153. Las placentas y otros órganos y tejidos que determine el reglamento podrán destinarse a la elaboración de productos terapéuticos y a otros usos que el mismo reglamento indique.

ANEXO F: Extracto de Reglamento sobre manejo de residuos de establecimientos de atención de salud (REAS).

- DTO. N° 6 DE 2009
- Publicado en el Diario Oficial de 04.12.09
- Modificaciones: Dto. N° 64/10, Minsal, publicado en el Diario Oficial de 17.07.10

Ministerio de Salud

SUBSECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA

APRUEBA REGLAMENTO SOBRE MANEJO DE RESIDUOS DE ESTABLECIMIENTOS DE ATENCIÓN DE SALUD (REAS)

Publicado en el Diario Oficial de 04.12.09

Visto: Lo dispuesto en los artículos 67, 78, 80, 81 y 82 del Código Sanitario, aprobado por decreto con fuerza de ley N° 725 de 1967, del Ministerio de Salud; en los artículos 4°, 7° y 12 del DFL N° 1 de 2005, del Ministerio de Salud y teniendo presente las facultades que me confiere el artículo 32 N° 6 de la Constitución Política del Estado, y

Considerando: La necesidad de prevenir y controlar los riesgos provenientes de los residuos que se generan en los establecimientos de atención de salud respecto de sus usuarios, de quienes se desempeñan en ellos, de quienes participan directamente en el manejo de los mismos y de la población en general,

Decreto: Apruébase el siguiente Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud:

TÍTULO I

Disposiciones generales

Artículo 1º.- El presente reglamento establece las condiciones sanitarias y de seguridad básicas a las que deberá someterse el manejo de los residuos generados en establecimientos de atención de salud.

Artículo 2º.- Para los efectos del presente reglamento, las expresiones que aquí se indican tendrán el significado que se señala:

Almacenamiento: Conservación de residuos en un sitio y por un lapso determinado;

Contenedor: Recipiente portátil o envase, en el cual un residuo es almacenado o transportado previo a su eliminación;

Desecho radiactivo: Cualquier sustancia radiactiva o material contaminado por dicha sustancia que, habiendo sido utilizado con fines médicos, sea desechado;

Eliminación: Conjunto de operaciones mediante las cuales los residuos son tratados o dispuestos finalmente mediante su depósito definitivo, incluyéndose en estas operaciones aquellas destinadas a su reutilización o reciclaje;

Establecimientos de Atención de Salud: Establecimientos asistenciales en los que se diagnostica, trata o rehabilita a las personas;

Generador: Establecimiento de atención de salud que dé origen a residuos correspondientes a las categorías de residuos especiales a que se refiere el presente reglamento;

Manejo de residuos: Conjunto de operaciones a las que se someten los residuos de establecimientos de atención de salud luego de su generación, que incluyen su almacenamiento, transporte y eliminación;

Minimización: Acciones para evitar, reducir o disminuir en su origen, la cantidad o peligrosidad de los residuos de establecimientos de atención de salud generados. Considera medidas tales como la reducción de la generación, la concentración y el reciclaje;

Residuo o desecho: Sustancia, elemento u objeto que el generador elimina, se propone eliminar o está obligado a eliminar;

Sustancia radiactiva: Cualquier sustancia que tenga actividad específica mayor de dos milésimas de microcurio por gramo o a 74 becquerels por gramo; y

Tratamiento: Todo proceso destinado a cambiar las características físicas, químicas o biológicas de los residuos, con el objetivo de neutralizarlos, recuperar energía o materiales o eliminar o reducir su peligrosidad.

TÍTULO II

De la identificación y clasificación

Artículo 3º.- Los residuos generados en establecimientos de atención de salud, se clasifican en las siguientes categorías según su riesgo:

Categoría 1: Residuos Peligrosos;

Categoría 2: Residuos Radioactivos de Baja Intensidad;

Categoría 3: Residuos Especiales; y

Categoría 4: Residuos Sólidos Asimilables a Domiciliarios.

Artículo 6º.- Son residuos especiales aquellos residuos de establecimientos de atención de salud sospechosos de contener agentes patógenos en concentración o cantidades suficientes para causar enfermedad a un huésped susceptible. En esta categoría se incluyen los siguientes:

- 1 Cultivos y muestras almacenadas: Residuos de la producción de material biológico; vacunas de virus vivo, placas de cultivo y mecanismos para transferir, inocular o mezclar cultivos; residuos de cultivos; muestras almacenadas de agentes infecciosos y productos biológicos asociados, incluyendo cultivos de laboratorios médicos y patológicos; y cultivos y cepas de agentes infecciosos de laboratorios.
- 2 Residuos patológicos: Restos biológicos, incluyendo tejidos, órganos, partes del cuerpo que hayan sido removidos de seres o restos humanos, incluidos aquellos fluidos corporales que presenten riesgo sanitario.
- 3 Sangre y productos derivados incluyendo el plasma, el suero y demás componentes sanguíneos y elementos tales como gasas y algodones, saturados con éstos. Se excluyen de esta categoría la sangre, productos derivados y materiales provenientes de bancos de sangre que luego de ser analizados se haya demostrado la ausencia de riesgos para la salud. Además se excluye el material contaminado que haya sido sometido a desinfección.
- 4 Cortopunzantes: Residuos resultantes del diagnóstico, tratamiento, investigación o producción, capaces de provocar cortes o punciones. Se incluye en esta categoría residuos tales como agujas, pipetas Pasteur, bisturís, placas de cultivos y demás cristalería, entre otros.
- 5 Residuos de animales: Cadáveres o partes de animales, así como sus camas, que estuvieron expuestos a agentes infecciosos durante un proceso de investigación, producción de material biológico o en la evaluación de fármacos.

Artículo 9º.- Cada servicio o zona de generación de residuos deberá contar con una adecuada cantidad de contenedores, según las categorías y volúmenes de éstos que en ella se generan y sus respectivas frecuencias de recolección.

En cada servicio o zona de generación los contenedores se deberán ubicar en un lugar previamente determinado y debidamente identificado.

Artículo 11.- Los generadores de residuos de establecimientos de atención de salud que deban sujetarse a un Plan de Manejo de Residuos deberán cumplir con lo señalado en el Título IX, Sistema de Seguimiento de Residuos Especiales.

TÍTULO IV

Párrafo II

Retiro y transporte interno

Artículo 15.- Los REAS deberán ser trasladados desde la zona o servicio de generación a la sala de almacenamiento de acuerdo a los requisitos establecidos en el presente título.

Párrafo III

Almacenamiento de residuos

Artículo 21.- Todo establecimiento que genere REAS deberá contar con, al menos, un área o sala de almacenamiento para los residuos, la que deberá estar ubicada y ser operada de forma tal que se minimicen las molestias y riesgos. Dicha sala o área deberá contar con autorización emitida por la autoridad sanitaria competente, a la que asimismo deberá entregarse copia del respectivo plan de operación.

TÍTULO V

De la eliminación

Artículo 24.- Todos los Residuos de Establecimientos de Salud deberán ser eliminados en instalaciones que cuenten con autorización sanitaria.

Artículo 25.- La disposición final de residuos especiales, tanto la efectuada por los propios generadores como aquella efectuada por terceros que presten servicio de eliminación, sólo podrá efectuarse si se dispone de autorización sanitaria para ello, la que se otorgará, previa aprobación por la Secretaría Regional Ministerial de

Salud competente del respectivo proyecto de ingeniería que deberá contemplar, al menos, los siguientes aspectos:

- 1.- Descripción técnica del proyecto.
- 2.- Plano de las instalaciones.
- 3.- Capacidad de tratamiento de residuos.
- 4 - Descripción de las operaciones.
- 5.- Almacenamiento de los residuos, si corresponde.
- 6.- Planes de operación y mantenimiento.
- 7- Plan de contingencia.

Artículo 26.- El manejo de residuos especiales en las instalaciones de eliminación se debe realizar sin que exista manipulación directa de éstos por parte de los operarios o trabajadores. Durante su manejo debe evitarse tanto la rotura de los recipientes o contenedores como el derrame de los residuos fuera del sistema de tratamiento.

Artículo 27.- El sistema de eliminación de residuos especiales deberá cumplir con los siguientes requerimientos:

- 1.- Llevar un registro de origen, categoría, fecha de recepción, fecha de eliminación y cantidad en peso o volumen de los residuos recibidos.
- 2.- Llevar un registro de los parámetros relevantes propios de la operación del equipo de eliminación.
- 3.- El almacenamiento de residuos especiales no deberá ser superior a 24 horas, salvo que se cuente con equipos de refrigeración.
- 4.- Los equipos deberán mantenerse en condiciones adecuadas de operación.
- 5.- Contar con personal capacitado para la correcta operación de la instalación.
- 6.- Mantener los registros mencionados en este artículo a disposición de la autoridad sanitaria por un período de al menos 2 años.

7.- Entregar un Informe trimestral a la Autoridad Sanitaria Regional que indique el establecimiento de origen y la cantidad de residuos especiales eliminados.

Artículo 29.- Las instalaciones que den tratamiento de incineración de residuos especiales, sin perjuicio de observar la normativa ambiental vigente, deberán cumplir, a lo menos, con los siguientes requerimientos:

- 1.- Contar con doble cámara de combustión.
- 2.- Contar con quemadores de combustible auxiliar.
- 3.- Asegurar que en ambas cámaras se alcancen temperaturas mínimas de operación de 850°C y que los tiempos de retención de los gases en la cámara secundaria no sea inferior a 1 segundo.

TÍTULO VI

Del transporte

Artículo 37.- Los vehículos empleados en el servicio de transporte de residuos especiales deberán ser de uso exclusivo para ello y ajustarse a lo siguiente:

- 1.- La caja de carga debe ser completamente cerrada y estanca para impedir el derrame de sólidos y/o líquidos. Su interior deberá ser liso, fácilmente lavable y de material impermeable y resistente a la corrosión.
- 2.- Contar con equipamiento para el control de derrames, que debe consistir, a lo menos, en material absorbente, desinfectante, bolsas o contenedores y equipos de protección personal.
- 3.- En el caso de utilizarse contenedores en el transporte de estos residuos, se deberá dar cumplimiento con lo señalado en el artículo 12 del presente reglamento.

Artículo 38.- La caja de carga de los vehículos deberá ser lavada luego de cada traslado de residuos y desinfectada semanalmente con una solución de cloro al 0.5% o una solución desinfectante de efectividad equivalente.

TÍTULO X

De la fiscalización y sanciones

Artículo 51.- Corresponde a las Secretarías Regionales Ministeriales de Salud, en su calidad de Autoridad Sanitaria, otorgar a las entidades ubicadas en sus territorios de su competencia las autorizaciones de que trata este reglamento, fiscalizar el cumplimiento de sus disposiciones y sancionar las infracciones al mismo, de conformidad con las normas que establece el Libro Décimo del Código Sanitario.