



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA EN TEJIDO Y CÉLULAS
CULTIVADAS *IN VITRO* PROVENIENTES DEL EPITELIO AMNIÓTICO HUMANO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA
M. EN C. GUADALUPE GARCÍA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. NÉSTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo de investigación de esta tesis, se realizó en el Laboratorio de Células Troncales del Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular del Instituto Nacional de Perinatología, como parte de mis estudios de Doctorado del posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el financiamiento otorgado a los proyectos 21041 y 21081.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a los proyectos 140917, 130627, 272968 y A1-S-8450.

Gracias a sus financiamientos se pudo llevar a cabo este trabajo de investigación.

Agradezco infinitamente a mi tutor, él Dr. Fabián Díaz.

Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar a tu lado.

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad"

Julio Verne

Con agradecimiento especial:

Al Dr. Horacio Merchant Larios y al Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, agradezco su amabilidad y disposición.

A la Dra. Anayansi Hernández, excelente persona e investigadora. Gracias por todo tu apoyo.

A Héctor Flores, invaluable amigo. Gracias por permitirme ser parte de tus colaboradores.

A mis compañeros, Irma Lidia Castro, Daniela Ávila, Omar Alarcón, Madai Castillo, Daniel Martínez, Jessica Romero, Jessica López, Berenice Márquez, Rocio Valle, Sarahi García y Luis Ramirez. Gracias por su amistad y apoyo.

Dedico este trabajo a mi esposo e hijos.

Enrique, Emilio y Fátima.

Los amo.

A mis padres, hermanos y sobrinos.

Agustín y Catalina.

Julia, Elia, Juan, Esmeralda y Lourdes.

Jaan Martín, Angelito, Oswaldo, Alondra, Jaan Cruz, Katherine, Johana, Jade, Mariana, Eduardo, Felipe, Angel y Sophie.

Gracias por su amor y apoyo incondicional.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
• Células troncales.....	3
• PSC.....	4
• La triada de pluripotencia.....	8
• Red de pluripotencia.....	12
• Vías de señalización involucradas en la pluripotencia.....	15
• Dilemas de las hPSC.....	18
• Membranas fetales humanas.....	22
• Heterogeneidad de las hAEC.....	23
• Origen embrionario del hAE.....	25
• Marcadores de pluripotencia en las hAEC.....	27
• Usufructo de las células del epitelio amniótico humano en la clínica.....	30
Hipótesis.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos particulares.....	32
Material y métodos.....	33
• Obtención del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	33
• Secuenciación masiva de RNAm del tejido proveniente de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	34
• Preparación de la librería de cDNA y RNA-seq.....	34
• Análisis bioinformático.....	34
• RT-PCR del tejido y las células de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	35
• Secuenciación de los productos de PCR.....	36
• qRT-PCR del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	37
• Microscopia confocal del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	37
• Aislamiento y cultivo de células del hEA de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	38
• Cultivo de las hESC.....	39
• Inmunofluorescencia en hAEC de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	39
• Conteo celular.....	40
Estadística.....	40
Resultados.....	41
• Secuenciación masiva de RNAm del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	41
• Expresión de factores de transcripción asociados a pluripotencia en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	45
• Células positivas a factores de transcripción asociados a pluripotencia en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	48
• Factores de transcripción asociados a pluripotencia en células en cultivo de las distintas regiones de la membrana amniótica humana.....	49
Discusión.....	54
Conclusiones.....	62
Bibliografía.....	63

RESUMEN

Las células troncales tienen la capacidad de auto-renovación y diferenciación a por lo menos un tipo celular especializado, éstas se clasifican de acuerdo a su potencial de desarrollo en: totipotentes, las cuales pueden diferenciarse a tipos celulares de las tres capas germinales, incluyendo células de la placenta; pluripotentes, poseen la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales con excepción a células de la placenta; multipotentes, derivan tipos celulares de un linaje específico y finalmente, unipotentes; las cuales solo tienen la propiedad de producir un solo fenotipo celular. La investigación de células troncales pluripotentes ofrece una promesa para entender los mecanismos básicos de la diferenciación y el desarrollo humano. Sin embargo, la derivación de líneas de células troncales pluripotentes a partir de embriones, conlleva controversias éticas y políticas. Por estas razones investigadores alrededor del mundo han buscado fuentes alternas de este tipo peculiar de células. De manera interesante, debido a su origen embrionario del epiblasto, se ha sugerido al epitelio amniótico humano como un reservorio de células con capacidad de pluripotencia. No obstante, a pesar de que estudios pioneros han reportado marcadores moleculares asociados a esta propiedad en dicho tejido, quedan diversas cuestiones por resolver; por ejemplo, se ha descrito que el epitelio amniótico no es un tejido homogéneo sino se encuentra dividido anatómicamente y fisiológicamente en tres regiones: refractaria, placentaria y umbilical. De esta forma, ninguno de los trabajos previos ha tratado de indagar si en una de estas zonas se encuentra una mayor densidad de células con características de células troncales. En el presente trabajo se estudiaron los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG en las distintas regiones del epitelio amniótico tanto en el tejido como en células *in vitro* mediante las técnicas de Seq-RNA, inmunofluorescencia y RT-PCR. Los resultados sugieren una distribución homogénea de los factores de pluripotencia en las distintas regiones del amnios humano, para aislar células que puedan ser usadas en la medicina regenerativa.

ABSTRACT

Stem cells have the capacity to differentiate into at least one specialized cell type, and the ability of self-renewal, these are classified according to their development potential into: totipotent cells, which can differentiate into cell types derived from any of the three germ layers, including cells of the placenta; pluripotent stem cells, which can differentiate into cells of the three germ layers except for placental cells; multipotent stem cells, which are restricted to cell types from a specific lineage and finally, unipotent stem cells; which can produce only one cellular phenotype. Pluripotent stem cell research offers great promise for understanding basic mechanisms of differentiation and human development. However, the derivation of pluripotent stem cell lines from embryos raises sharp ethical and political controversies. Therefore, researchers around the world have sought alternative sources of this peculiar type of cells. Interestingly, due to its embryonic origin of the epiblast, the human amniotic epithelium has been suggested as an accessible reservoir of pluripotency-capable cells. However, although pioneering studies have reported molecular markers associated with this property in the tissue, there are still some issues to be resolved. For example, it has been reported that the amniotic epithelium is not an homogeneous tissue but instead it is anatomically and physiologically divided into three regions: refractory, placental and umbilical. In this respect, none of the previous studies have attempted to investigate whether there is a higher density of cells found in one of these regions which exhibits characteristics of stem cells. Here, the transcription factors of OCT4, SOX2 and NANOG were studied in the different regions of the amniotic epithelium both in tissue and in cells in vitro using the techniques of Seq-RNA, immunofluorescence and RT-PCR. The results suggest an homogeneous distribution of pluripotency factors in the different regions of the human amnion, to isolate cells which can be used in regenerative medicine.

INTRODUCCIÓN

Células Troncales

Las células troncales (SC, por sus siglas en inglés *Stem Cells*) se caracterizan por su capacidad de auto renovación y diferenciación a por lo menos un tipo celular funcional. Se han derivado desde etapas tempranas del desarrollo del embrión hasta tejidos de animales adultos y se pueden clasificar de acuerdo a su potencial de diferenciación. De esta forma, en los mamíferos, el cigoto y las blastómeras tempranas se consideran SC totipotentes, ya que pueden generar un organismo vivo completo, es decir pueden crear tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios. Con un potencial más restringido se encuentran las SC pluripotentes (PSC, por sus siglas en inglés *pluripotent stem cells*) las cuales son capaces de producir solamente los tipos celulares provenientes de las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) tanto *in vivo* como *in vitro*, *vgr*, las SC embrionarias, las SC del epiblasto y las SC pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés *induced pluripotent stem cells*) (Jaenisch and Young 2008). Por otra parte, las SC multipotentes dan ascendencia a los tipos celulares dentro de un mismo linaje como las SC neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Finalmente, las SC unipotentes son aquellas que solo pueden dar procedencia a un tipo celular específico, por ejemplo; las SC del epitelio intestinal. Debido a que las SCP pueden dar origen a teóricamente todos los tipos celulares han mantenido el interés de la comunidad científica por su posible uso en la medicina regenerativa. No obstante, el empleo tanto de las SC embrionarias como de las iPSC, conllevan ciertos inconvenientes, motivo por el cual se ha continuado con la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención de estos tipos celulares, como podría ser el epitelio amniótico humano (hAE, por sus siglas en inglés *human amniotic epithelium*).

PSC

El concepto de obtener SC en el laboratorio se remota desde la década de los 60, en donde se había reportado que las SC del embrión *in vivo* podían proliferar por solo un periodo limitado de tiempo *in vitro*. Debido a esta observación se pensó que este tipo de células no se podían mantener sin sufrir una transformación maligna. No obstante, la investigación realizada en teratocarcinomas proporciono las bases para la derivación de PSC.

Estudios pioneros demostraron que el trasplante de los surcos genitales o embriones en etapa tempranas de desarrollo en sitios ectópicos tales como las capsulas renales de un animal adulto, daba origen a cepas de ratones capaces de producir teratocarcinomas, los cuales no lo generaban de forma espontánea (Stevens 1968, Solter, Skreb et al. 1970). Dichas neoplasias malignas, derivadas de la línea germinal, estaban conformadas por tejido diferenciado de las tres capas embrionarias y de SC denominadas células del carcinoma embrionario (EC, por sus siglas en inglés *Embryonal Carcinoma*) (Andrews 1988). De forma interesante, estos tumores podían ser trasplantados de forma seriada en animales adultos dependiendo si el componente EC persistía o se diferenciaba.

Posteriormente, se reportó que las células de EC al ser inyectadas en blastocitos de ratón podían contribuir al desarrollo normal de los tejidos de la quimera o producir nuevas neoplasias (Illmensee and Stevens 1979). Con ello, la demostración de que una sola célula derivada del tumor era capaz de producir todos los tipos celulares que conformaban al teratocarcinoma, sugería que estas estructuras poseían un tipo único de SC, la cual tenía la capacidad de poder diferenciarse hacia múltiples linajes idénticos a los de los tejidos de animales adultos. No obstante, la diferenciación era al azar e impredecible.

Años más tarde, mediante el refinamiento en las técnicas de cultivo y de manera notable con la adición de una capa de células nodriza, permitió a los grupos de Martin y

Evans clonar líneas celulares del teratocarcinoma de manera rutinaria en el laboratorio, las cuales crecían en forma de colonias compactas y estrechas; conformadas por células con un núcleo grande, prominente nucléolo y escaso citoplasma. Estas podían proliferar de forma indefinida y producir teratocarcinomas al ser inyectados de forma subcutánea; mientras que al ser cultivadas en cajas bacteriológicas formaban cúmulos, a los cuales se le denominaron cuerpos embrionarios (formados por un centro de SC y rodeados de células epiteliales), debido a sus características similares con embriones post implantación del ratón. A dichas SC se les dio el nombre de células del EC (Damjanov 1993).

Cabe mencionar que la derivación y caracterización de líneas del EC tanto de humano como de ratón dependió de la búsqueda de marcadores específicos, los cuales deben de tener ciertas propiedades como reconocer a la célula viva, tener una especificidad exclusiva (pluripotencia) y eliminar su señal durante el proceso de diferenciación. La primera molécula que cumplió con dichas características fue la enzima fosfatasa alcalina tejido inespecífica, la cual se expresa de forma alta en células de la masa celular interna del blastocisto del ratón, en células germinales primordiales y en células del EC, tanto del ratón como del humano. Posteriormente, con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales a mediados de la década de los 70's, se descubrió que el antígeno embrionario etapa específica 1 (SSEA1, por sus siglas en inglés *Stage-Specific Embryonic Antigen*) reaccionaba con las células del EC del ratón. Asimismo, se determinó que moléculas de superficie de naturaleza polisacárido pertenecientes a una serie de gangliósidos-globo conocidos como antígenos embrionarios etapa específica también cumplían con los requerimientos antes mencionados. De esta forma, las células del EC de ratón expresan SSEA1 y al momento de diferenciarse expresan SSEA3 y 4, mientras que las células humanas presentan un patrón inverso.

Por otra parte, la demostración de que los teratocarcinomas podían ser derivados de embriones implantados en sitios extrauterinos sembró la idea del concepto de que las SC del embrión temprano y de estas neoplasias podían ser parecidas, si es que no idénticas. De esta forma, el siguiente paso era el de obtener SC directamente de los embriones *per se*, lo cual fue conseguido por dos grupos independientes y de forma simultánea, quienes aislaron líneas celulares con características similares a las del EC a partir de blastocistos de ratón, a las cuales se les denominó ESC (por sus siglas en inglés *Embryonic Stem Cells*). Su derivación se logró al crecer la masa celular interna del blastocisto en medio condicionado de células del EC o sobre una capa nodriza de fibroblastos extraídos de embriones de ratón (MEF, por sus siglas en inglés *Mouse Embryonic Fibroblast*) de 14 días de gestación, los cuales producían factores solubles como el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, por sus siglas en inglés *Leukemia Inhibitor Factor*), que permitieron mantener a las células de la masa celular interna en un estado de pluripotencia *in vitro* (Evans and Kaufman 1981, Martin 1981). Dichas células expresaban todos los marcadores de las EC (SSEA-1, TRA-1-60 y TRA-1-81) y poseían una extraordinaria capacidad de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo* y podían ser mantenidas por largos periodos de cultivo sin presentar aberraciones cromosómicas.

Con procedimientos similares a los usados para derivar a las mESC (mESC; por sus siglas en inglés *mouse Embryonic Stem Cells*), se generaron ESC, a partir de primates no humanos (monos Rhesus) de 15 años de edad. Para ello, blastocistos de 6 días post ovulación obtenidos mediante la técnica de *flushing* uterino, en los cuales el trofoectodermo fue removido por inmunocirugía al incubar los embriones con antisuero anti-*Rhesus* hecho en conejo seguido por la exposición con complemento del conejillo de indias. Con ello aislaron la masa celular interna y fue cultivada en una capa de MEF en la presencia de LIF humano durante 16 días (Thomson, Kalishman et al. 1995).

Posteriormente, diversos factores se conjuntaron (experiencia obtenida con las ESC de primates; obtención de una fuente de embriones humanos de buena calidad provenientes de clínicas de fertilización *in vitro*, superando todas las cuestiones éticas-legales y financiamiento por parte de compañías privadas) para poder derivar las primeras líneas de SC humanas (hESC, por sus siglas en inglés *human Embryonic Stem Cell*) con cariotipo XY (H1, H13, H14) y XX (H7 y H9) (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Dichas células se caracterizaron por tener un alto radio núcleo-citoplasma, nucléolo prominente, formar colonias planas con bordes bien definidos, alta expresión de telomerasa, expresión de marcadores de superficie SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y ser positivas para la enzima fosfatasa alcalina tejido inespecífica. Asimismo, fueron capaces de diferenciarse *in vitro* a derivados de las tres capas germinales y al ser inyectadas a ratones inmunodeficientes-SCID (por sus siglas en inglés *Severe combined immunodeficient-beige mouse*) dieron origen a teratomas (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998).

Por otra parte, en 2006 Takahashi y Yamanaka, en un hallazgo sin precedentes, lograron la reprogramación de células somáticas de ratón a un estado pluripotente, utilizando solamente 4 factores de transcripción Oct-4, Sox-2, c-Myc y Klf4 (Takahashi and Yamanaka 2006). Para ello, los investigadores probaron una lista de 24 posibles genes candidatos que pudieran estar involucrados en la reprogramación. De esta forma, expresaron los genes postulantes en diferentes combinaciones y permutaciones en un vector retroviral y las células reprogramadas fueron seleccionadas por su capacidad para expresar la proteína Fbxo15 (asociada a la pluripotencia), las cuales presentaban una morfología, capacidad de proliferación, expresión génica, actividad de telomerasa y capacidad de diferenciación similar a las ESC, ellos denominaron a las células obtenidas iPSC. Posteriormente, este mismo grupo de investigadores en 2007 demostró la generación de iPSC a partir de fibroblastos dérmicos humanos adultos con los mismos cuatro factores antes mencionados (Takahashi,

Tanabe et al. 2007). Este hallazgo fue confirmado por el grupo de Thompson. No obstante, ellos reportaron el uso de OCT-4, SOX2, NANOG y Lin28 para lograr la reprogramación (Yu, Vodyanik et al. 2007).

A partir de estos estudios, diversas metodologías se han reportado para lograr la reprogramación a partir de células somáticas, las cuales abarcan desde el uso de vectores que se integran al DNA (traducción retroviral o lentiviral); inducción de los factores mediante vectores adenovirales o plásmidos, en los cuales, no se da una integración al genoma hospedero; vectores removibles; o alternativas que no emplean ácidos nucleicos como son el uso de proteínas específicas o miRNAs (Cho, Lee et al. 2010, Anokye-Danso, Trivedi et al. 2011, Gonzalez, Boue et al. 2011).

Finalmente, se ha reportado la derivación y mantenimiento de SC del epiblasto (EpiSC, por sus siglas en inglés *Epiblast Stem Cells*) del ratón, dichas células fueron obtenidas de tejido post implantación, utilizando metodologías similares a las empleadas para derivar ESC de *homo sapiens*. De esta forma, se obtuvieron colonias con características similares a las de naturaleza humana y expresaban los genes asociados a pluripotencia. No obstante, las EpiSC tienen diferencias al compararse con las ESC de la misma especie, *vgr*, la regulación de la expresión de Oct-4 es dirigida por el *enhancer* proximal (Takahashi, Tanabe et al. 2007), su capacidad para integrarse a la línea germinal y formar quimeras es sumamente limitada a diferencia de su contraparte derivada de la masa celular interna. De esta forma, las EpiSC presentan características similares a las hESC, lo cual podría reflejar su origen del epiblasto tardío (Brons, Smithers et al. 2007).

La triada de la pluripotencia

Se ha descrito que OCT4, SOX2 y NANOG conforman el núcleo del circuito de pluripotencia. OCT4 (conocido como OCT3 o OCT3/4) es codificado por el gen POU5F1 y

pertenece a la familia de los factores de transcripción POU (Pit-Oct-Unc), la cual incluye a los miembros Pit-1, Oct1 y Unc-86. Cada uno de los miembros de esta familia contiene un dominio POU bipartita, que consiste de aproximadamente 160 aminoácidos, dividido en dos subdominios, uno amino-terminal POU específico (POU_S) de 74-82 aminoácidos y otro homeodominio carboxi-terminal de 60 aminoácidos (POU_{HD}), los cuales están conectados por una región espaciadora variable de 15-27 aminoácidos (Verrijzer, Alkema et al. 1992). Las referidas moléculas se unen al DNA y son fundamentales para la activación de la transcripción junto con la participación de otros factores de transcripción uniéndose a secuencias adyacentes de DNA (Herr and Cleary 1995).

En el humano, el gen de OCT-4 está localizado en el cromosoma 6 en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés, *Major histocompatibility complex*) con una longitud de 7 kb, mientras que el transcrito consiste de los exones 1, 2b, 2d, 3 y 4. El gen codifica para tres isoformas de RNAm, sin embargo, por “*splicing*” alternativo genera cinco isoformas; OCTA-360, OCT-4B-265, OCT-4B-190, OCT-4B164 y OCT4B1 (Figura 1) (Wang, Zhao et al. 2009). Se ha reportado que la isoforma OCT-4A está restringida en SC y células del EC (Takeda, Seino et al. 1992, Atlasi, Mowla et al. 2008, Gao, Wang et al. 2010) (Niakan and Eggan 2013).

La importancia de *Oct-4* durante el desarrollo ha sido descrito en diversos modelos de estudio; *in vivo*, su expresión es evidente en la masa celular interna, en el epiblasto y en las células germinales primordiales. De forma particular, en el ratón, se ha reportado su expresión materna residual en ovocitos no fertilizados y en las etapas de segmentación subsecuentes (Palmieri, Peter et al. 1994). En mono Rhesus, su expresión se inicia en la etapa de 4-8 células y en todas las blastómeras.

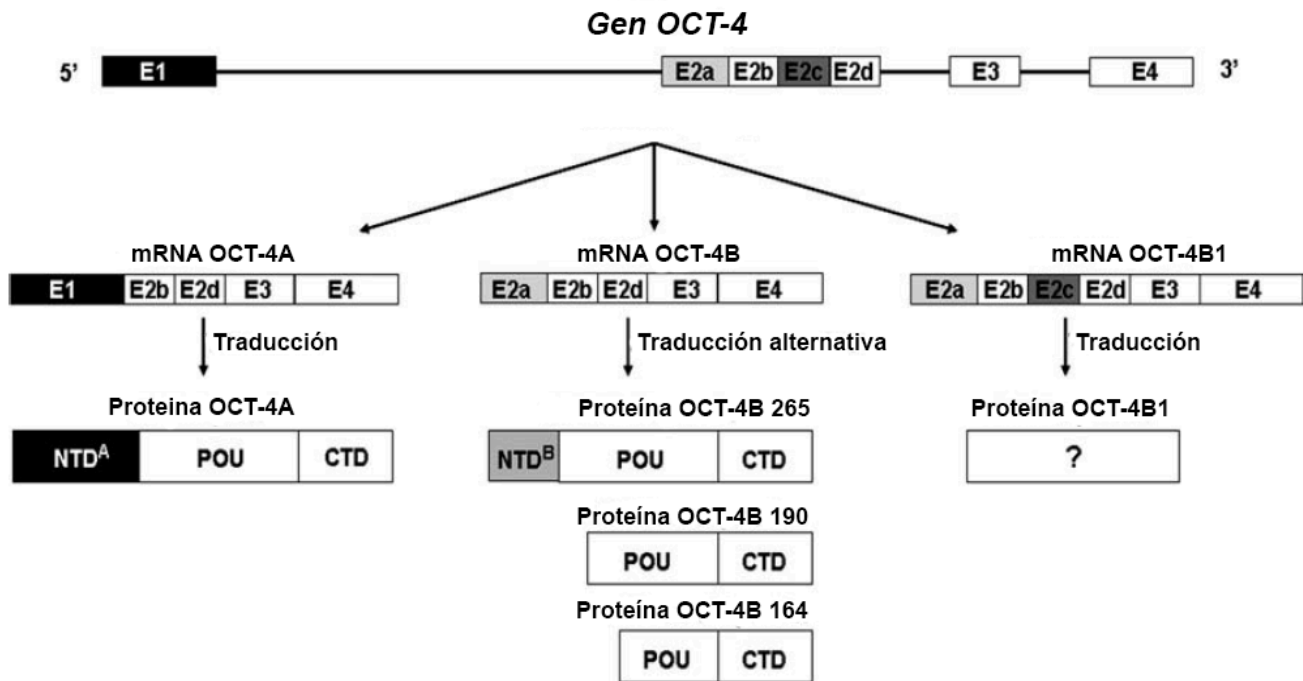


Figura 1. Representación del gen y productos de proteína de OCT4 humano. El gen puede generar tres isoformas de RNAm; *OCT4A*, *OCT4B* y *OCT4B1*. EL RNAm de *OCT4A* se traduce en la proteína *OCT4A*, el RNAm de *OCT4B* se traduce en tres isoformas de proteínas; *OCT4B 265*, *OCT4B 190* y *OCT4B-164*. El RNAm de *OCT-4B1*, se desconoce si se traduce a proteína. CTD: dominio carboxilo terminal; NTD: dominio amino terminal, POU: homeodominio POU. Modificado de (Wang and Dai 2010).

Una vez formado el blastocisto, la marca de la proteína disminuye en el trofoectodermo y comienza a restringirse en la masa celular interna (Mitalipov, Kuo et al. 2003), donde es requerido para mantener la pluripotencia (Nichols, Zevnik et al. 1998); mientras que la pérdida de su expresión está relacionada con la diferenciación hacia ectodermo (Matin, Walsh et al. 2004). En humanos, *OCT-4* es inicialmente expresado en embriones de 8 células en el día 3 post-fertilización y se restringe a la masa celular interna en blastocisto de 128-256 células. De forma interesante, este factor, es el único constante en todos los métodos de reprogramación de células somáticas a iPSC reportados en la literatura.

Por otra parte, *NANOG* pertenece a la familia de los genes homeobox, en el *homo sapiens* está localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.31) y se conforma por

cuatro exones y una homeobox (Booth and Holland 2004), la cual está formada por un dominio de 180 pares de bases y actúa como factor de transcripción al regular la expresión de genes blancos (Allouba, ElGuindy et al. 2015) (Figura 2).

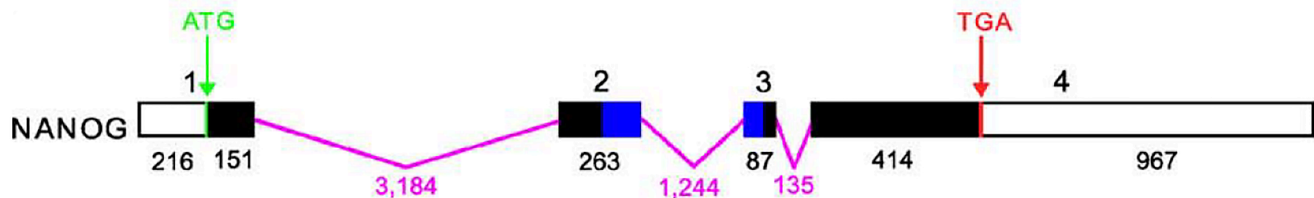


Figura 2. Estructura del gen de *NANOG* en humano. El gen está conformado de 4 exones, representados por barras horizontales; las regiones 5' y UTR se muestran en blanco, la región que codifica para proteína en negro y la región homeobox en azul. Los tres intrones son representados con líneas rosas. Los números inferiores, representan la longitud de cada uno de los exones e intrones. (Los exones 1 y 4 están divididos en regiones codificantes y no codificantes/UTR). Los codones de inicio (ATG) y paro (TGA) están marcados con una línea vertical en verde y rojo, respectivamente (Booth and Holland 2004).

En el ratón, *Nanog* codifica para una proteína de 305 residuos de aminoácidos, los cuales, pueden ser divididos en tres regiones con base en la posición del homeodominio (Pan and Pei 2003). El RNAm de *Nanog* ha sido identificado en diversas líneas de mESC, así como en el embrión en desarrollo en la mórula compacta, principalmente en las células internas que darán lugar a la masa celular interna. Durante la etapa de blastocisto, su expresión está confinada en la estructura antes mencionada y ausente en el trofoectodermo; mientras que, en el blastocisto tardío, está restringido en el epiblasto y excluido del endodermo primitivo. Durante la etapa de implantación inicia a disminuir su expresión. En las mESC se ha reportado que *Nanog* puede mantener la pluripotencia en ausencia de LIF (Chambers, Colby et al. 2003, Mitsui, Tokuzawa et al. 2003).

El nivel de expresión de *NANOG* en hESC es regulado por la unión de *OCT-4* y *SOX-2* a su región promotora (Kuroda, Tada et al. 2005). De manera interesante, *NANOG* junto

con *LIN28* pueden reemplazar a *KLF4* y *c-MYC* en el coctel original de reprogramación de las iPSC.

Por lo que se refiere a *SOX-2*, es un miembro de la familia de genes relacionados a *SRY* (región determinante del sexo del cromosoma Y) los cuales contienen un dominio del grupo de alta movilidad conservada (HMG box de 79 aminoácidos) que media su unión al DNA. Este grupo comprende aproximadamente 20 miembros, perteneciendo *SOX-2* al subgrupo B1 (Pevny and Lovell-Badge 1997). En el humano, el gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 3 en la región q26.3-27, codificando para una proteína que incluye una secuencia motivo conocida como caja de alta movilidad (HMG del inglés *High Mobility Group*) (Stevanovic, Zuffardi et al. 1994).

Durante el desarrollo del ratón, el RNAm de *Sox2* ha sido detectado en células de la mórula (2.5 días dpc, por sus siglas en inglés *days postcoitum*) y en blastocisto (3.5 dpc), específicamente en la masa celular interna, persiste en el epiblasto, pero disminuye su concentración cuando surge el surco primitivo (7.0-7.5 dpc), para restringir su expresión al neuroectodermo. Al 9.5 dpc, se localiza en el cerebro, tubo neural, placodas sensoriales, arcos branquiales y endodermo intestinal. Además, está presente en células germinales tanto masculinas como femeninas (Avilion, Nicolis et al. 2003). Finalmente, se ha descrito que la activación del gene endógeno de *Sox-2* es un paso limitante que permite la transición de la fase estocástica a la determinista en el proceso de reprogramación de células somáticas (Buganim, Faddah et al. 2013).

Red de pluripotencia

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la pluripotencia en mamíferos es controlada por señales específicas extrínsecas y por una red interconectada y jerárquica de genes, siendo unos cuantos factores de transcripción (involucrados en la pluripotencia) los

nodos concentradores. De esta forma, los implicados regulan sus blancos de forma cooperativa y mantienen el balance del circuito mediante retroalimentación positiva y negativa. Asimismo, se ha descrito que esta red es sustentada a diferentes niveles de regulación post transcripcional como son la traducción de RNA, modificación de proteínas e intercambio, así como cambios epigenéticos y metabólicos.

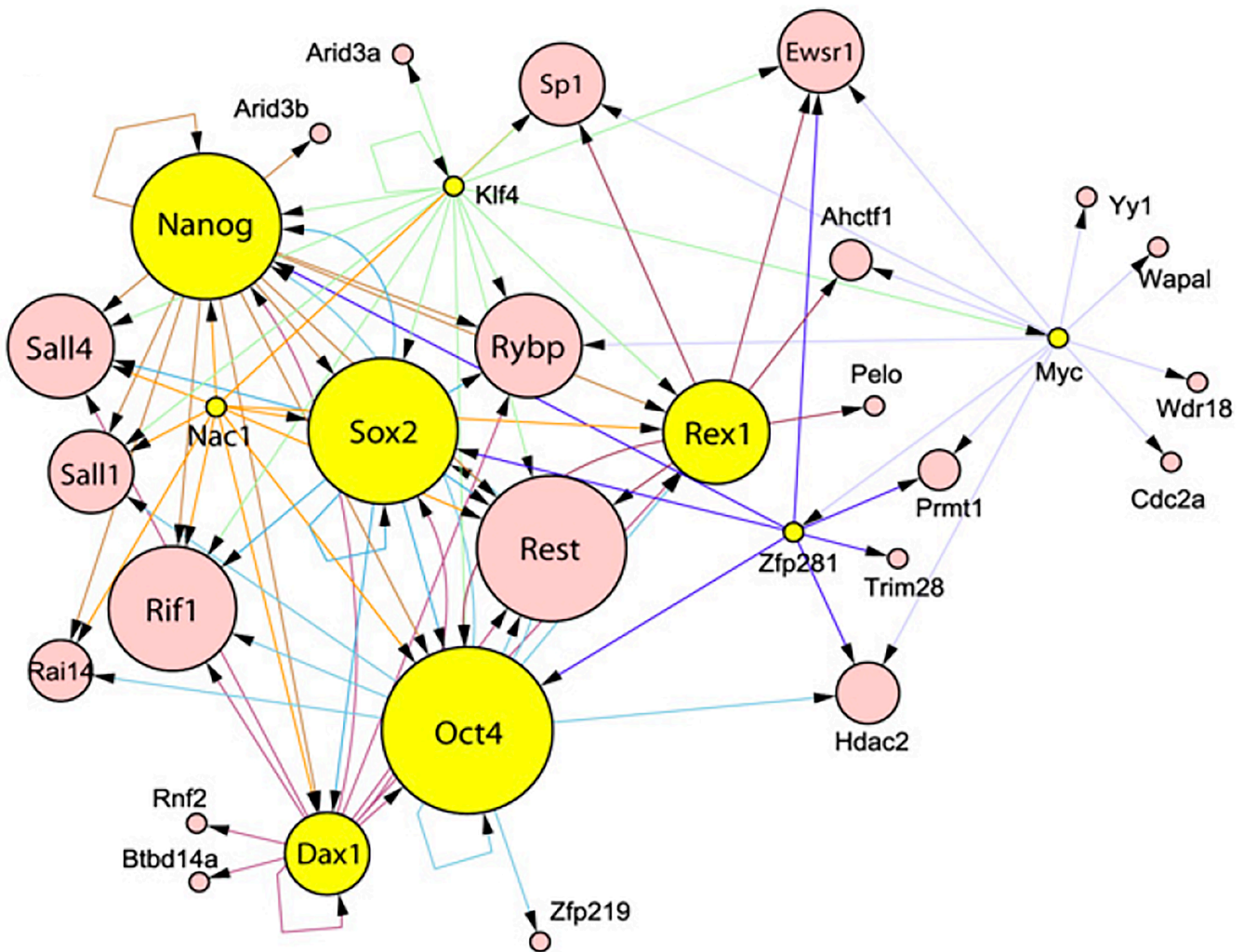


Figura 3. Red de pluripotencia en las mESC anclada a los reguladores maestros Oct-4, Sox-2 y Nanog (Zhou, Chipperfield et al. 2007).

Con ello, la pluripotencia se puede propagar indefinidamente cuando el circuito alcanza un balance en su expresión o se pierde (diferenciación) cuando las funciones de un elemento clave disminuyen de forma considerable.

Los primeros indicios de cómo se regulaba dicho circuito indicaban que la triada funcionaba de forma colaborativa para mantener su propia expresión y de esta manera la pluripotencia, controlando directamente la regulación transcripcional que especifica la diferenciación hacia linajes extraembrionarias, así como a las capas germinales (Boyer, Lee et al. 2005, Jaenisch and Young 2008).

Con el advenimiento de técnicas como espectrofotometría de masas, purificación por afinidad y co-inmunoprecipitación, permitieron extender esta red e identificar nuevos integrantes (Sall1, Sall4, Rif1, Tif1b, Mybbp, Dax1, Nac1, Zfp281, Err2, Elys, Oct4, Zfp198, NF45 y HDAC2, REST, Sp1 y Wap1) para el mantenimiento del estado indiferenciado de las mESC (Wang, Rao et al. 2006). Asimismo, se confirmó el papel de Esrrb, Stat3, Tcf7, Sall4 y LRH-1, como correguladores de este fenómeno (Figura 3) (Zhou, Chipperfield et al. 2007).

Por lo que se refiere al humano, se creó una red de interacción de factores de transcripción con base en experimentos utilizando RNA de interferencia. Para construirla, se tomaron 67 genes identificados como determinantes de la pluripotencia de las hESC. La información de las posibles interacciones, fueron predichas con base en evidencias experimentales y basadas en homología, entre estos 67 factores mediante la base de datos STRING (Figura 4). Los investigadores encontraron a) una fuerte evidencia de la triada en su papel determinante en la pluripotencia, b) que los factores de transcripción muestran una colaboración en la red de interacción de proteína y c) que el complejo NuRD es frecuentemente reclutado en dicha red (Ng and Lufkin 2011). Estos datos sugieren que los determinantes de la pluripotencia en el ratón y en el humano son altamente divergentes.

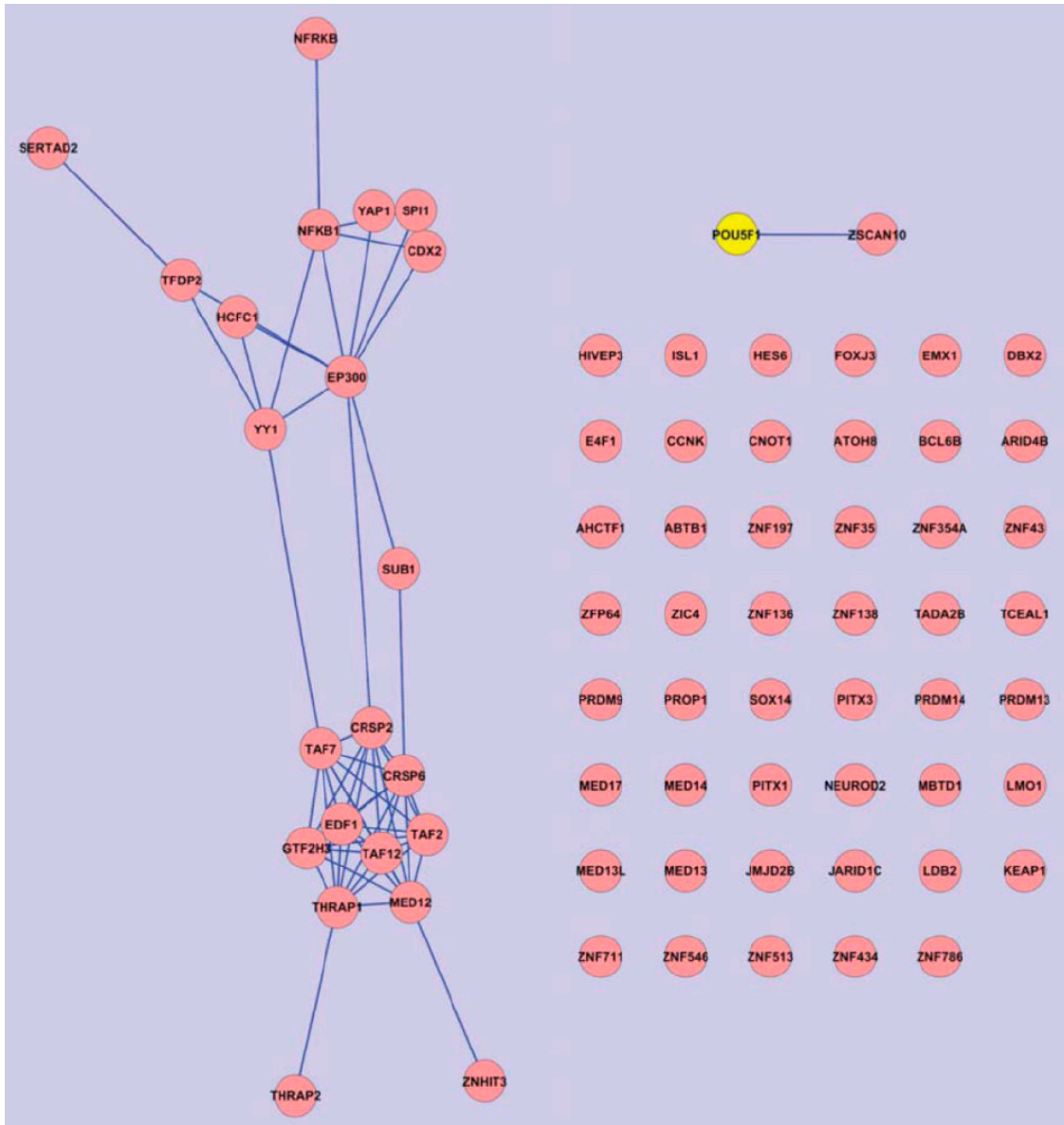


Figura 4. Red de interacción de factores de transcripción en las hESC. La red es construida con base en los factores de transcripción que fueron encontrados vía RNAi para tener un papel en la pluripotencia. Se cargaron un total de 67 factores de transcripción en la base de datos online STRING para buscar posibles interacciones (Ng and Lufkin 2011).

Vías de señalización involucradas en la pluripotencia

La pluripotencia no es solamente regulada por factores intrínsecos, sino también por señales externas que desencadenan vías de señalización que afectan el estado molecular de la célula. De esta forma, se ha descrito que la proliferación de las mESC depende de LIF (Niwa, Burdon et al. 1998). Dicha molécula es un miembro de la familia de interleucina-6, la cual se une a un complejo heterodimérico de dos receptores, uno de superficie de baja

afinidad (Lifr) y a Gp130. Sus dominios citoplasmáticos están unidos a tirosinas de cinasas (cinasas janus (Jaks)), que son activados por autofosforilación cuando se unen sus ligandos y de esta forma fosforilan los residuos de tirosina en los motivos Y-x-x-Q de Gp130 y Lifr, lo que permite la activación intracelular de tres vías de señalización: Jak-Stat3, fosfatidilinositol 3 cinasa (*PI3K*, por sus siglas en inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*) y las proteínas de cinasas activadas por mitógeno (*MAPK*, por sus siglas en inglés *mitogen-activated protein kinase*). Las dos primeras de facilitan la autorenovación, mientras que la tercera promueve la diferenciación.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación se ha detectado que Stat3 co-ocupa sitios blancos con Brg-1, en *Oct-3/4*, *Sox-2* y *Nanog* (Ho, Miller et al. 2011), lo cual sugiere una regulación global transcripcional por Stat3 en genes claves de la pluripotencia.

Además, se ha descrito que la vía de PI3K activa las vías de señalización tanto de Akt como mTOR (Hirai, Karian et al. 2011) y que su inhibición farmacológica conlleva a la pérdida de la autorenovación de las mESC reprimiendo a *Nanog*, *Esrrb*, *Tbx3* y *Tcl1* (Welham, Storm et al. 2007, Storm, Kumpfmüller et al. 2009).

Asimismo, LIF a través Shp2-Grb/Sos activa la vía de señalización de MAPK (Cheng, Saxton et al. 1998), la cual tiene un impacto negativo en la autorenovación de las mESC mediante la inhibición de los factores de transcripción *Klf2*, *Nanog* y *Tbx-3*, tanto a nivel transcripcional como en los niveles, localización y estabilidad de proteína (Hamazaki, Kehoe et al. 2006, Niwa, Ogawa et al. 2009, Yeo, Jiang et al. 2014).

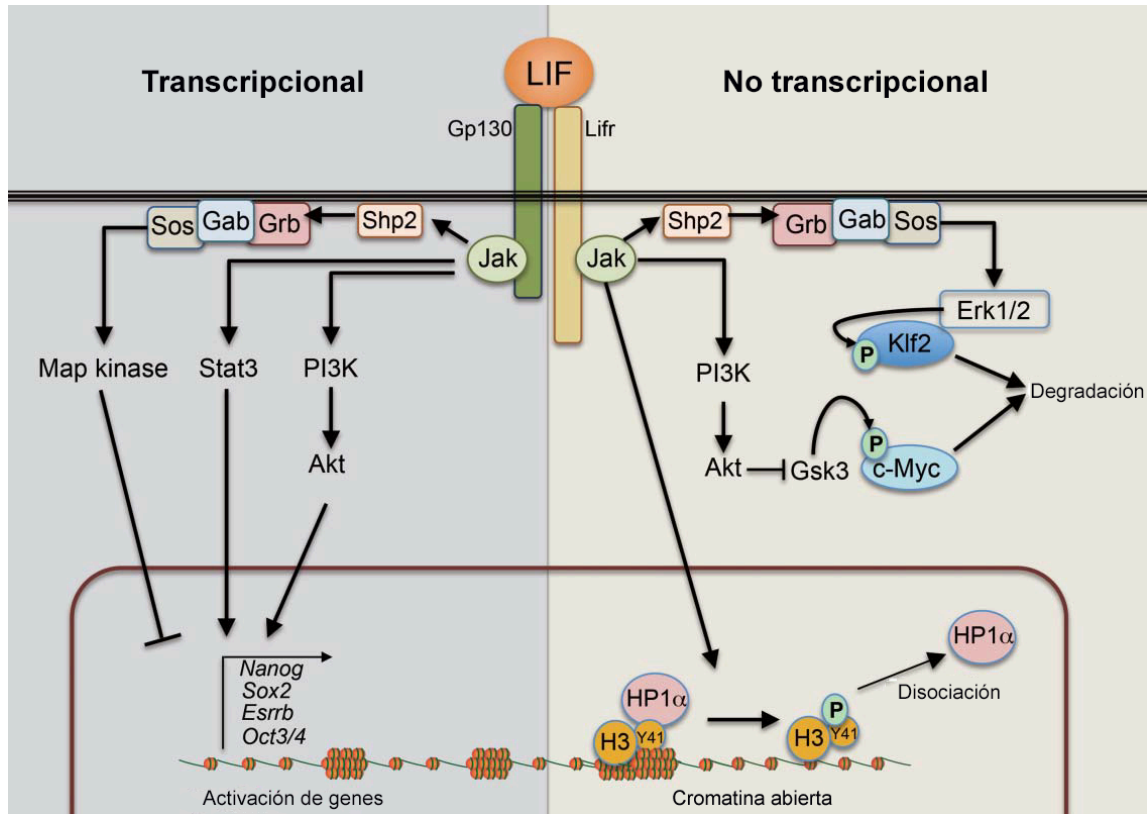


Figura 5. Representación de las vías de señalización mediadas por LIF para la autorenovación en las mESC.

Por otra parte, se han reportado mecanismos no transcripcionales involucrados en la regulación de la pluripotencia, como la sinergia de las funciones de LIF y BMP. De esta forma, las BMPs suprimen Erk1/2 y la vía de señalización de MAPK p38 (Qi, Li et al. 2004), lo que lleva al desequilibrio de la autorrenovación, ya que Erk1/2 conduce a la ubiquitinación y degradación de Klf2 vía el proteosoma (Yeo, Jiang et al. 2014). Asimismo, el eje LIF-PI3K puede conducir a la degradación de c-myc al ser fosforilado por Gsk3 (Cartwright, McLean et al. 2005). Finalmente, se ha descrito que las Jaks pueden actuar por medio de modificaciones epigenéticas (Dawson, Bannister et al. 2009, Griffiths, Li et al. 2011)(Figura 5).

Por lo que se refiere a las hESC, se ha descrito que la vía principal para mantener la autorenovación es mediante FGF2, la cual promueve las vías de señalización de JAK/STAT, PI3K-Akt, PKC y ERK2. Por otra parte, se ha reportado que la vía de señalización TGF β /Activina/Nodal es necesaria mediante la señalización de SMAD2/3, lo cual se logra, al unirse los ligandos a receptores de TGF β tipo I (RI) y II (RII), así como a los receptores cinasas tipo activina (ALK); provocando la unión de SMAD2/3 a la región promotora proximal de NANOG para incrementar su expresión (Vallier, Mendjan et al. 2009). Asimismo, mediante análisis ChIP-seq se ha descrito que otros blancos de la señalización de Activina/Nodal incluyen a OCT4 y Myc (Brown, Teo et al. 2011) (Figura 6).

Dilemas de las hPSC

Por sus características, de autorenovación en estado indiferenciado, así como su capacidad de diferenciación a tipos celulares especializados, las PSC humanas son consideradas una promesa en terapias de reemplazo celular y una herramienta esencial en biología del desarrollo. Sin embargo, existen obstáculos que se deben superar antes de que se conviertan en una realidad.

Uno de los grandes problemas que se han tenido es la posible formación de teratomas al ser trasplantadas (Hentze, Soong et al. 2009), ya que debido a su naturaleza existe el riesgo latente en que después de realizar protocolos de diferenciación queden células indiferenciadas que puedan formar un tumor, situación que debe estar totalmente controlada antes de llevar este tipo de células de forma rutinaria a la clínica.

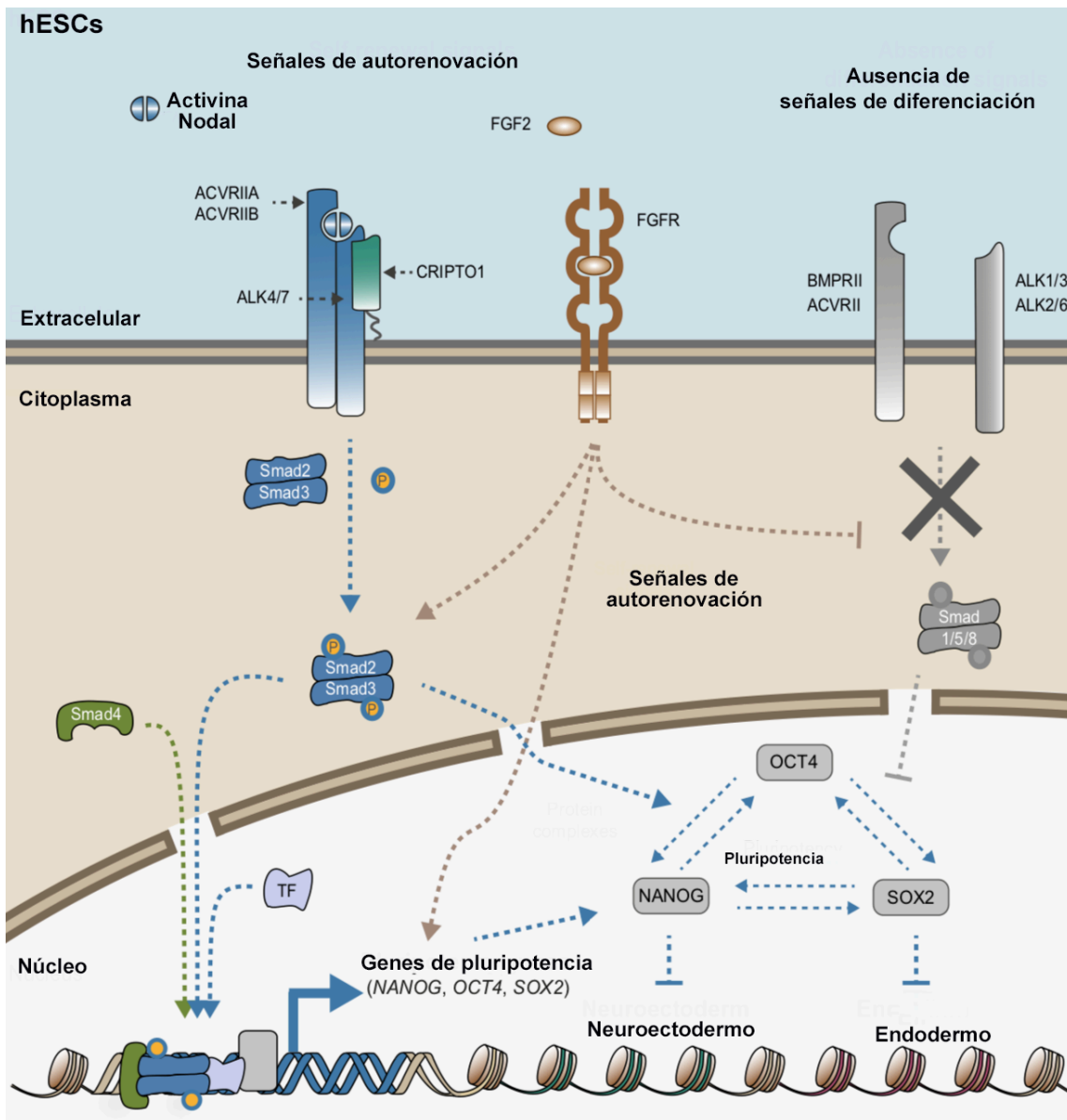


Figura 6. Vías de señalización que mantienen la autorenovación de las hESCs. Las señales de la vía Activina/Nodal son mediadas por las proteínas Smad2/3, las cuales, una vez fosforiladas se unen a las proteínas de OCT-4 y NANOG, y co-regulan un número amplio de genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia. Estos factores de pluripotencia, incluyen OCT-4, NANOG y SOX2, los cuales bloquean la diferenciación hacia mesodermo y neuroectodermo, mientras coordinan la autorenovación de las hESCs (modificado de (Pauklin and Vallier 2015)).

Diferentes laboratorios han tratado de resolver esta problemática con metodologías que abarcan desde inducir la apoptosis por genes suicidas o a través de moléculas inductoras o la obtención de poblaciones altamente purificadas (Schuldiner, Itskovitz-Eldor et al. 2003, Bieberich, Silva et al. 2004, Chung, Shin et al. 2006, Fukuda, Takahashi et al. 2006,

Barberi, Bradbury et al. 2007). No obstante, a pesar de los esfuerzos realizados no se han obtenido resultados alentadores.

Asimismo, se ha reportado que las PSC humanas expresan los HLA (por sus siglas en inglés, *human leukocyte antigen*) clase I, que junto a la II forman el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las moléculas presentadoras de antígeno codificadas por dicho complejo son glicoproteínas de superficie que unen péptidos intra y extracelulares, presentándolos a las células T con lo cual desempeñan un papel importante en el sistema inmune; en particular en el rechazo de trasplantes y compatibilidad de tejidos entre donador y receptor (Choo 2007). De esta forma, debido al gran polimorfismo del CMH en las PSC humanas (hPSC, por sus siglas en inglés *human pluripotent stem cells*) obstaculiza el encontrar un duplo que sea compatible y facilita al sistema inmune que las reconozca como patógeno invasor. Asimismo, no se sabe que sucede con el HLA al ser diferenciadas a un tipo celular en específico (Saljo, Barone et al. 2017).

Otro punto importante es el número limitado de líneas celulares con las cuales se cuenta en la actualidad. Ya que se ha estimado de que de 150 líneas de CT embrionarias humanas solo cubrirían las necesidades de compatibilidad de HLA-A, HLA-B y HLA-DR para el trasplante de órganos de solamente el 20% de los donadores (Taylor, Bolton et al. 2005). Situación que es más complicada en países en donde las líneas derivadas no sobrepasan más de una decena como es el caso de nuestro país o inclusive donde no se hayan derivado.

Como ya se mencionó anteriormente las SC embrionarias humanas en condiciones estándar son cultivadas en una capa alimentadora de origen animal. No obstante, se ha reportado que los MEF contienen ácido siálico Neu5Gc, contra el cual, el *homo sapiens* produce anticuerpos circulantes. Por ello, la exposición del suero humano a anticuerpos para Neu5Gc resulta en la unión de inmunoglobulinas y deposición del complemento, lo cual

podría conducir inclusive a la muerte (Martin, Muotri et al. 2005). Asimismo, la exposición de las hESC a células o productos animales, representan un riesgo de infección por proteínas prion, las cuales se ha reportado están implicadas en el control de la autorenovación y la diferenciación. Por ejemplo la sobreexpresión de la proteína prion induce la diferenciación espontánea, inhibe la diferenciación hacia linajes de las tres capas germinales y permite la alta actividad proliferativa (Lee and Baskakov 2013).

Por otra parte, se han detectado cambios cromosómicos en las hESC como aneuploidía de los cromosomas 12, 17 y X después de 50 pasajes (Spits, Mateizel et al. 2008), lo cual se ha asociado con alteraciones en la proliferación y posible formación de tumores.

Finalmente, otro aspecto muy importante y que ha sido polémico desde la derivación de las primeras líneas de CT embrionarias humanas es la cuestión ética-legal, argumento basado en creencias culturales y religiosas, en donde se doctrina que la vida humana inicia desde la concepción, haciendo no ético la destrucción de un cigoto o un embrión, o incluso un blastocisto para la derivación de una línea celular (de Wert and Mummery 2003, Shevde 2012). Inclusive, países como Alemania e Italia prohíben la derivación de nuevas líneas de hESC en la actualidad.

Para evitar estas cuestiones legales y posibles problemas de inmunocompatibilidad, se han propuesto a las iPSCs como una alternativa. No obstante, se ha reportado que este tipo de células mantienen una memoria epigenética, ya que albergan firmas de metilación de DNA residual del tejido somático del cual provienen, lo cual favorece la diferenciación a linajes relacionados con el fenotipo de la célula donadora y restringe destinos celulares alternativos (Kim, Doi et al. 2010). Asimismo, estudios de secuenciación masiva del genoma de las iPSC, han señalado variaciones en el número de copias (CNV) y en un nucleótido (SNV) en elementos reguladores y en sitios de unión de factores de transcripción

involucrados en la pluripotencia, de esta forma mostrando un paisaje regulador genético distinto (DeBoever, Li et al. 2017). De forma interesante, estudios de secuenciación de exoma completo han demostrado que un 75% de mutaciones de las iPSC son adquiridas durante el método de reprogramación celular, el cual puede ser resultado de los factores oncogénicos y del estrés genotóxico (Ji, Ng et al. 2012). Por lo anterior, se han buscado fuentes alternas como los anexos fetales.

Membranas fetales humanas

Las membranas fetales humanas (MFH) son tejidos extraembrionarios que delimitan la cavidad amniótica, están constituidas por dos capas histológicas adosadas: el amnios y el corion, las cuales están formadas por diferentes tipos celulares (Malak, Ockleford et al. 1993). La primera es una estructura translúcida que carece de nervios, músculos o vasos linfáticos, su grosor varía de 0.02 a 0.5mm, alcanza una longitud de 1876 ± 307 cm² a término (Millar, Stollberg et al. 2000) e histológicamente se le ha descrito: una capa epitelial, la membrana basal y tejido mesénquimal. La capa más interna, células del epitelio amniótico humano (hAEC, por sus siglas en inglés *human Amniotic Epithelial Cells*), adyacente al líquido amniótico, está constituida por una capa homogénea de células cuboides firmemente adheridas a la membrana basal, la cual a su vez está unida a un estrato acelular compuesto de colágena tipo I, II y V. Dichas células tienen microvellosidades en su superficie apical, presentan un núcleo grande irregular, diversos organelos intracitoplasmáticos y vesículas pinocíticas. Las mitocondrias son escasas y pequeñas mientras que el aparato de Golgi puede ser abundante o escaso motivo por el cual se ha sugerido diferentes tipos de células epiteliales (Malak, Ockleford et al. 1993). Por otra parte, el corion es de 3 a 4 veces más ancho que el amnios y se le ha descrito una capa reticular, una membrana basal y una capa de trofoblastos, la cual se adhiere a la decidua materna. La capa reticular está compuesta de

colágeno tipo I, III, IV, V y VI, mientras que la membrana basal ancla los trofoblastos a la capa reticular mediante colágeno IV, fibronectina y laminina (Figura 7) (Bourne 1960).

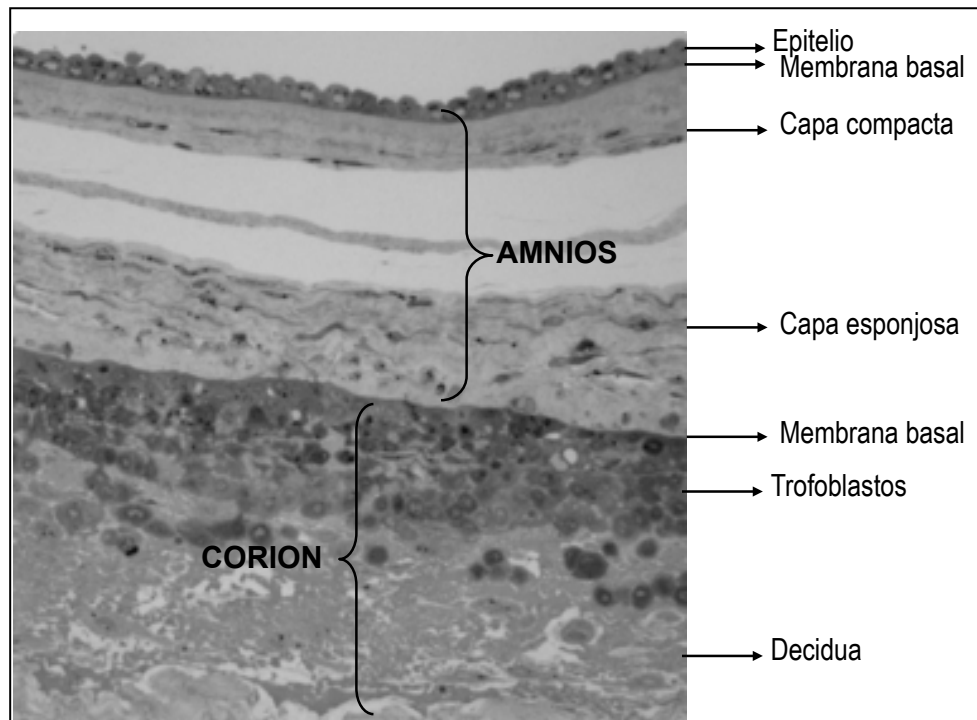


Figura 7. Corte semifino ($1\mu\text{m}$) de membranas fetales humanas de 40 semanas de gestación obtenidas mediante cesárea programada incluidas en EPON y teñidas con azul de toluidina al 0.5%. Corte transversal (20X) en el que se distinguen las dos regiones adosadas que las constituyen: amnios y coriodecidua. Tomado de la tesis de Maestría de García López Guadalupe.

Heterogeneidad de las hAEC

El amnios, junto con el corion se extiende sobre los márgenes del disco placentario para envolver al feto dentro de la cavidad amniótica y darle tanto protección durante su desarrollo como un ambiente de suspensión, en el cual pueda crecer sin distorsión por presión de las estructuras que los rodean. Asimismo, ambas membranas facilitan el intercambio de gas y desechos y desempeña un papel crítico como barrera de defensa contra infecciones, traumas y toxinas (Benirschke 2000).

Por otra parte, la ultraestructura de las hAEC sugiere que cumplen con una función de transporte celular y secretora. No obstante, se ha sugerido la existencia de diferencias en la

cito arquitectura de dicho tejido de acuerdo a su región. De esta forma se ha descrito amnios placentario (ubicado sobre la placenta), refractario (el cual se encuentra en la membrana fetal extra placentaria) y umbilical (recubriendo el cordón umbilical). Las células de la primera región tienden a ser más cilíndricas que las de la segunda y presentan un mayor contenido de estroma. De forma interesante, estas disparidades conllevan implicaciones biológicas.

La falta de homogeneidad se ha señalado como etiología de la patología denominada ruptura prematura de membranas de embarazos a término, la cual se deriva de una zona específica de la membrana, en donde la apoptosis de las células amnióticas y la inducción de la metaloproteasa 9 y colagenasa conduce a la ruptura del tejido, lo que desencadena tanto contracciones uterinas como el trabajo de parto (Malak and Bell 1994).

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP, por sus siglas en inglés *parathyroid hormone related protein*) es distinta en la membrana amniótica humana, siendo más alta en el amnios placentario con respecto al refractario (Ferguson, Gorman et al. 1992).

Asimismo, mediante la técnica de microarreglos se ha sugerido que dichas regiones son biológicamente heterogéneas ya que sus transcriptomas difieren sustancialmente y varios de los genes expresados diferencialmente son funcionalmente relevantes, vgr, la respuesta proinflamatoria es mucho mayor en el amnios placentario después de un tratamiento con lipopolisacarido en comparación a su contraparte (Han, Romero et al. 2008).

De manera interesante, se ha evidenciado que la transparencia (porcentaje de transmisión de luz visible en las longitudes de 450 y 600nm) de las regiones refractaria y placentaria es diferente, ya que la primera es más transparente que la segunda (Deihim, Yazdanpanah et al. 2016).

Por lo que se refiere a la transferencia de agua y solutos hacia la circulación fetal; proceso denominado absorción intramembranosa (IMA, por sus siglas en inglés

Intramembranous absorption), el cual tiene 2 componentes: un transporte vesicular unidireccional con solutos disueltos a través de las células del amnios y una difusión pasiva de agua por gradientes osmóticos desde el líquido amniótico hasta la sangre fetal a través de aquaporinas (AQP, por sus siglas en inglés *aquaporin*). De esta forma, se ha reportado que los niveles de RNAm de AQP son más alto en la región placentaria que en la refractaria, lo que soporta diferencias regionales en función del transporte (Bednar, Beardall et al. 2015).

Finalmente, se ha demostrado que la actividad mitocondrial en la región placentaria es más alta que en la refractaria (Banerjee, Weidinger et al. 2015).

Origen embrionario del hAE

De manera histórica se ha descrito que el corion y el mesodermo amniótico se originaban del hipoblasto, mientras que el hAE se derivaba directamente del epiblasto. No obstante, por varias décadas, la única evidencia de la formación del amnios en primates fue mediante análisis histológicos y no fue hasta 1986 en donde un estudio minucioso permitió conocer cómo era el proceso de amniogénesis en primates (mono Rhesus) (Enders, Schlafke et al. 1986).

En fechas recientes, tres grupos de investigación obtuvieron pruebas más contundentes del origen del amnios humano. De forma independiente, se han cultivado por primera vez embriones humanos supernumerarios postimplantación hasta un estadio equivalente a los 13 días post fertilización (dpf). Reportaron que una vez que el blastocisto se adhería a la placa de cultivo, el trofoectodermo comenzaba a expandirse y al mismo tiempo, la ICM se segregaba en endodermo primitivo y epiblasto. En ambos trabajos se describió que a los 8-9 dpf las células del epiblasto comenzaban a adquirir una polarización basal-apical y a organizarse de forma radial alrededor de una pequeña cavidad central (Figura 8-A). Dado los antecedentes de los trabajos hechos en primates, se consideró que la

formación del pequeño lumen en el sitio exacto de la incipiente polarización apical del epiblasto era el nacimiento de la cavidad amniótica y, por lo tanto, una prueba de que el amnios proviene en efecto del epiblasto. Posteriormente, al 10-11 dpf, mediante técnicas de reconstrucción tridimensional detectaron dos grupos celulares positivos a OCT-4 pero morfológicamente distintos; uno localizado cerca del hipoblasto con una morfología columnar y otro en una situación opuesta con forma aplanada, poblaciones que darán origen al disco del epiblasto y el hAE prospectivo, respectivamente (Figura 8-B) (Deglincerti, Croft et al. 2016, Shahbazi, Jedrusik et al. 2016).

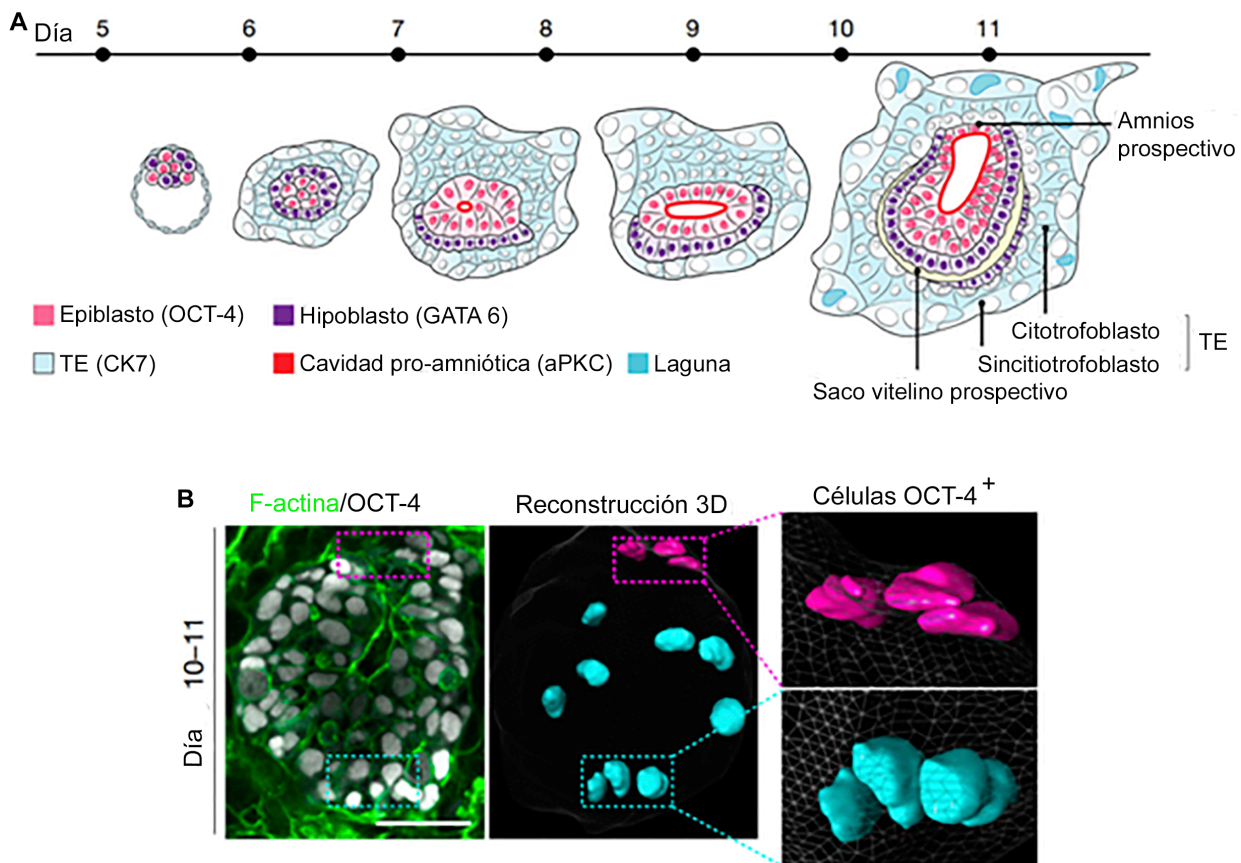


Figura 8.- Origen del hAE. En A, modelo de la morfogenésis de la implantación del embrión humano. Principales eventos que tienen lugar durante esta etapa de transición: segregación del epiblasto (día 8-10), diferenciación del trofoectodermo (TE) hacia células de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, formación del hAE prospectivo, saco vitelino prospectivo y disco bilaminar (10-11). En B, reconstrucción 3D de la morfología, de las células representativas que expresan OCT-4 (Shahbazi, Jedrusik et al. 2016).

Un tercer grupo, mimetizó los procesos que ocurren en el epiblasto después de la implantación en un cultivo 3D de hPSC. De forma sorprendente, las células formaron un quiste conformado por un epitelio columnar con una morfología escamosa que expresaban genes descritos previamente en tejido del amnios humano del primer trimestre de gestación, pero no presentaban marcadores del surco primitivo, lo que llevó a la conclusión que la amniogénesis humana ocurre por la auto-organización de las SC en un nicho sintético que simula la implantación (Shao, Taniguchi et al. 2017).

Bajo estos antecedentes, puede asumirse que el hEA proviene directamente del epiblasto post implantación, antes de que ocurra la formación del surco primitivo durante la gastrulación y por lo tanto la pérdida de la pluripotencia, lo que sugiere que estas células pueden mantener una población de PSC.

Marcadores de pluripotencia en las hAEC

Dado su origen embrionario, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar si estas células podían tener marcadores de pluripotencia.

En 2004, Tamagawa y cols. fueron los primeros en describir características de PSC en las hAEC, al crear quimeras xenogénicas *in vitro* a partir de células aisladas del amnios humano con células embrionarias de ratón. Ellos demostraron la contribución de las células humanas a la formación de tejidos de las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo) mediante la formación de cuerpos embrionarios (Tamagawa, Ishiwata et al. 2004). Si bien estos hallazgos no han sido confirmados por otro grupo de investigación, constituye una de las pruebas más rigurosas para comprobar la pluripotencia con la formación de quimeras.

Posteriormente, diversos grupos de forma independiente, reportaron que en las hAEC era posible encontrar células que expresaban el RNAm de los factores de transcripción

(OCT-4, SOX-2, NANOG, CFC1, DPPA3, PROM1 y PAX-6 (Miki, Lehmann et al. 2005, Ilancheran, Michalska et al. 2007). Asimismo, detectaron a la proteína de POU5F1 y SOX-2 en el núcleo. Sin embargo, sólo una minoría de las células (4.8% y 6.3%, respectivamente) eran positivas para dichos marcadores.

Por lo que se refiere a los antígenos de superficie asociados a pluripotencia (Thy-1, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA-4, SSEA3, GCTM2), también fueron encontrados en las células. Resaltando el hallazgo que el 96 y 98% del total de ellas fueron positivas para SSEA-4 y GCTM2, respectivamente (Ilancheran, Michalska et al. 2007). Asimismo, se ha reportado que las hAEC no presentan SSEA-1 (antígeno de superficie específico de ratón) (Miki, Lehmann et al. 2005).

Otro hallazgo importante sobre las células, es su capacidad de formar de colonias, en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EFG, por sus siglas en inglés *Epidermal growth factor*) y del actor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por sus siglas en inglés *basic fibroblast growth factor*) (Ilancheran, Michalska et al. 2007).

Debido a que las células presentaban marcados de pluripotencia, el siguiente paso de la comunidad científica fue el de determinar si las hAEC derivadas de las MFH tenían la capacidad de diferenciarse. De esta forma, surgieron diversos reportes en donde las hAEC presentan marcadores de tipos celulares especializados (células pancreáticas, neurales, hepáticas y cardiacas) al someterse a protocolos de diferenciación dirigida (Miki, Lehmann et al. 2005, Ilancheran, Michalska et al. 2007, Evron, Goldman et al. 2011). Por ejemplo, se ha reportado que las hAEC pueden presentar características de células tipo- β , incluyendo la expresión de genes relacionados a desarrollo y función de la célula (Insulina, Pdx-1, Isl-1, Pax-6, Nk2.2, Glut-2, GcK), así como la producción y liberación de péptido C en respuesta a glucosa y otros estímulos extracelulares (KCl y tolbutamida). De manera interesante, al trasplantar dichas células en ratones C57/B1 diabéticos (inducidos por estreptozotocina)

resultó en un control de glucosa en sangre por 30 días y permitió que el peso corporal fuera restaurado (Hou, Huang et al. 2008). Asimismo, las hAEC fueron diferenciadas a progenitores corticales, los cuales fueron detectados por mediante fluorescencia por la presencia de marcadores específicos (OTX2, TBR2, b-III tubulina y NeuN) (Garcia-Castro, Garcia-Lopez et al. 2015). La tabla 1 muestra los diferentes reportes de diferenciación a las 3 capas embrionarias a partir de las hAEC.

Marcadores de células troncales					
Primer autor	Journal	Factores de transcripción	Antígenos de superficie	Diferenciación de linaje	PMID
Miki T	Stem Cells. 2005	OCT4, NANOG, SOX2	SSEA3, SSEA4, TRA1-60,	Ect, Mes, End	16081662
Ilancheran S	Biol Reprod. 2007	OCT4, SOX2, NANOG	SSEA4, GCTM2	Ect, Mes, End	17494917
Liu T	Shock. 2008	OCT4	n.d.	Ect	18414234
Evron A	Int J Stem Cells. 2011	OCT4, NANOG, SOX2	SSEA3, SSEA4, TRA1-60	Mes (Myo)	24298345
Zhou K	Cell Reprogram. 2013	OCT4, NANOG, SOX2	n.d.	Mes (Adi, Ost), Ect	23298399
Bryzek A	Ginekol Pol. 2013	n.d.	SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81	n.d.	24505948
Resca E	Placenta. 2015	OCT4	SSEA4, TRA1-81	Ect, Mes, End	25468543
García-Castro IL	PLoS One. 2015	OCT4, NANOG,	SOX2 SSEA3, SSEA4, TRA1-60	Ect	26720151
Jiang LW	J Dermatol Sci. 2016	OCT4	SSEA4	n.d.	26596214
Kim MS	PLoS One. 2016	OCT4, NANOG, SOX2	n.d.	n.d.	27218821
Ding C	Stem Cell Res Ther. 2017	OCT4, NANOG	SSEA4, TRA1-81	n.d.	28750654
Maymo'	JL PLoS One. 2018	OCT4, NANOG, SOX2	SSEA4	End (Hep)	29346426
Zou G	Int J Mol Med. 2018	OCT4, NANOG, SOX3	n.d.	End (Panc)	29393344

Tabla 1. Adi, adipogénico; Ect, linaje Ectodermo; Hep, hepático; Mes, linaje mesodermo; Myo, miogénico, nd., no determinado; Ost, osteocítico; Panc, pancreático; PMID, identificador único en PubMed. Tomado de (Miki 2018).

Usufructo de las hAEC en la clínica

Las membranas fetales han sido consideradas como una fuente valiosa de células con propiedades inmunosupresoras y de regeneración. De esta forma, se ha descrito el uso de ellas para tratar quemaduras severas por más de un siglo. En particular, las hAEC producen numerosas citocinas y factores de crecimiento, los cuales promueven la proliferación y la diferenciación celular. Gracias a estas propiedades desde la segunda mitad del siglo XX se han descrito como uno de los primeros biomateriales usados en la ingeniería de tejidos a manera de matriz biológica para soportar el crecimiento y migración celular (Niknejad, Peirovi et al. 2008). Entre los diversos tratamientos que se basan en el uso de estas células podemos mencionar el de lesiones o la reconstrucción de la superficie ocular, el cierre de la herida en cirugía torácica, úlceras crónicas y quemaduras severas de la piel, entre otros (Lim 2017).

Además, las hAEC tienen otras características importantes, por ejemplo: tienen baja o nula respuesta al rechazo inmunológico, ya que han sido trasplantado en voluntarios sanos y después de 54 días, no hubo evidencia de producción de anticuerpos citotóxicos (Akle, Adinolfi et al. 1981). Asimismo, producen tanto factores inmunomoduladores, incluyendo HLA-G y ligando de FAS (Kubo, Sonoda et al. 2001) como citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-6 e IL-10) (Zaga-Clavellina, Garcia-Lopez et al. 2007, Motedayyen, Fathi et al. 2018). Otra peculiaridad, es la secreción específica de beta defensinas, que actúan como la primera línea de defensa ante la presencia de antígenos bacterianos (Kjaergaard, Hein et al. 2001, Garcia-Lopez, Flores-Espinosa et al. 2010, Zaga-Clavellina, Garcia-Lopez et al. 2012) y la expresión de la Cistatina E, la cual tiene una secuencia similar a la Cistatina 2 (molécula que reacciona contra proteínas virales) (Vernekar, Velhal et al. 2015). También, se ha reportado una actividad anti angiogénica (Dawson, Volpert et al. 1999, Shao, Sima et al. 2004).

No obstante, y a diferencia de las hESC, las hAEC no son capaces de formar teratomas, ya que al ser inoculadas a una densidad de 5×10^5 células en testículos de ratón inmunodeficiente, no se observó la formación de tumores después de 10 semanas (Ilancheran, Michalska et al. 2007), mismos resultados fueron encontrados al inyectar 1×10^6 células en el hígado y en los músculos de las piernas traseras del ratón SCID (Miki, Lehmann et al. 2005). Estos datos demuestran que la hAEC al ser inyectadas en el ratón inmunodeficiente no son capaces de formar teratomas, propiedad que sería de gran utilidad en la clínica, ya que uno de los grandes problemas en la aplicación de las hESC es la posible formación de teratomas al ser trasplantadas en estado indiferenciado. Finalmente, cabe mencionar que su uso y derivación no conlleva problemas ético-legales, ya que solo se necesita el consentimiento informado por parte de la madre.

La información mencionada anteriormente, sugiere que las células del hAE tienen características de SC, aunado a otras características que la hacen una fuente ideal de SC. Sin embargo, debido a la heterogeneidad que existe en el amnios no se conoce si este fenómeno está presente en las células que presentan marcadores de pluripotencia de la membrana amniótica.

Hipótesis

El tejido del hAE tendrá diferentes poblaciones de células positivas a los marcadores de pluripotencia dependiendo de la región anatómica de la cual se deriven y al ser cultivadas *in vitro* conservarán estos marcadores

Objetivo general

Caracterizar a las hAEC de las distintas regiones anatómicas tanto en tejido como *in vitro* para los marcadores de pluripotencia OCT4, NANOG y SOX2.

Objetivos particulares

- ❖ Analizar la expresión global de genes en tejido de las tres regiones de la membrana amniótica humana.
- ❖ Determinar a la triada de pluripotencia en tejido del hAE de las tres regiones anatómicas.
- ❖ Analizar a OCT4, SOX2 y NANOG de las hAEC obtenidas de las distintas regiones de la membrana amniótica en cultivo.

Material y métodos

Obtención del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Se seleccionaron placentas de mujeres con edades gestacionales de 37-40 semanas, sin evidencia de trabajo de parto activo, ni antecedentes de patologías previas o características clínicas y/o microbiológicas de infección, que fueron intervenidas quirúrgicamente por cesárea; bajo previa firma del consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e investigación del Instituto Nacional de Perinatología con número de registro 212250-21081.

La placenta fue transferida de la unidad de tococirugía del Instituto al laboratorio en solución salina, donde fueron manejada bajo estrictas condiciones de esterilidad. Se identificó y se disecaron las diferentes regiones del amnios (refractario (MAR), placentario (MAP) y umbilical (MAU)) (Figura 9). Posteriormente, el tejido amniótico fue separado mecánicamente del corion y lavado con solución balanceada de Hanks 1X hasta eliminar todos los residuos de sangre y coágulos. Muestras de cada porción del tejido fueron procesadas y analizadas mediante las diferentes técnicas que a continuación se describen.

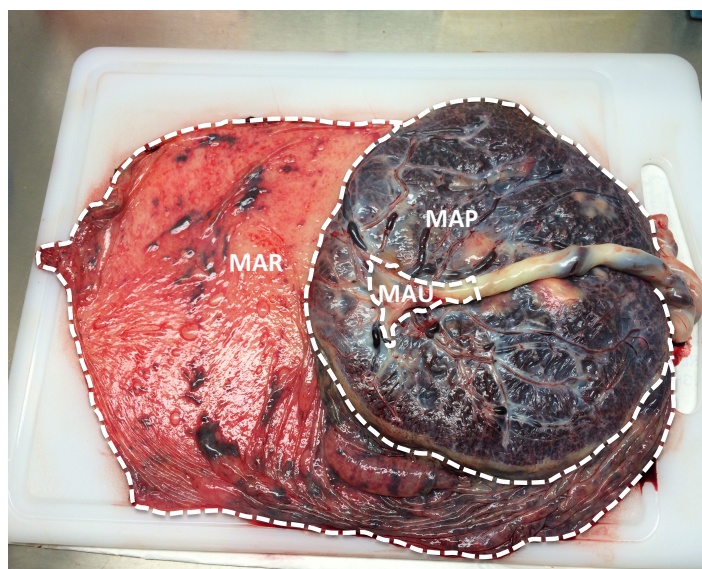


Figura 9. Regiones anatómicas de la membrana amniótica humana.
MAR; refractaria, MAP; placentaria y MAU; umbilical.

Secuenciación masiva de RNAm del tejido proveniente de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Preparación de la librería de cDNA y RNA-seq

Se aisló el RNA total del tejido de las tres regiones del hAE y con el kit TruSeq RNA Sample (Illumina, San Diego, CA, USA) se generaron las librerías necesarias, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la secuenciación del transcriptoma utilizando el equipo analizador de genome GAIIx (Illumina) con una configuración de lectura *paired end* a una longitud de 75 pb, en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática en el Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con el Dr. Alejandro Sánchez Flores.

Análisis bioinformático

El control de calidad de las lecturas crudas fue realizado usando el software FASTQC software 33 y fue removida la contaminación junto con el adaptador mediante un programa *in-house Perl*. Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma humano (referencia GRCh38.p9) usando SMALT v0.7.6. Posteriormente, se realizaron lecturas por duplicado usando el software Picard Tools v2.18.2, el cual generó archivos BAM; a partir de los cuales se realizaron los conteos totales por duplicado para cada una de las muestras usando el programa coverageBed (BEDtools) y todas las muestras fueron fusionadas usando un script *in-house Perl*. El análisis de expresión diferencial fue ejecutado usando el servidor IDEAMEX (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>) con corridas de los programas DEseq, DEseq2, EdgeR y NOISeq. El resultado de intersección de los cuatro métodos fue usado para todos los análisis posteriores, en donde la expresión diferencial de genes fue reportada como regulados hacia arriba o hacia abajo para cada condición. Finalmente, los análisis de

enriquecimiento en términos GO y KEGG fueron realizados usando la WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://www.webgestalt.org/>).

RT-PCR del tejido y de las células de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Se determinó el RNAm de los distintos marcadores moleculares de pluripotencia mediante la técnica de RT-PCR de acuerdo a condiciones previamente reportadas (Avila-Gonzalez, Vega-Hernandez et al. 2015, Garcia-Castro, Garcia-Lopez et al. 2015, Avila-Gonzalez, Martinez-Alarcon et al. 2019). Brevemente, el RNA del tejido o de las células de las diferentes regiones de la membrana amniótica se aisló utilizando el método de fenol-cloroformo (Trizol®, Invitrogene®, Thermo Fisher). Posteriormente, se obtuvo el cDNA mediante el sistema de transcripción reversa; para ello, 800ng de RNA se llevaron a un volumen total de 20µl de una mezcla de reacción, la cual contenía MgCl₂ 5mM, buffer de transcripción reversa 1X (Tris-HCl 10mM [pH 9.0 a 25°C]; KCl 50mM; Tritón X100 al 0.1%), dNTP 1mM, inhibidor de ribonucleasas 1u/µl (RNasin), transcriptasa reversa AMV 15u/µl e iniciador Oligo (dT) 0.5µg) (todos ellos de Promega, Wisconsin, USA). La mezcla de reacción se incubó a 42°C por 60 minutos, 95°C por 5 minutos y finalmente a 4°C por 5 minutos.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó la reacción para la amplificación de PCR mediante el sistema GoTaq (Promega, Wisconsin, USA). Para este fin, 500ng de cDNA se adicionaron a una reacción que contenía, dNTPs 200µM, MgCl₂ 2mM, buffer de transcripción reversa 1X, *primer forward* y *reverse* 50pmol y 2.5 unidades de DNA polimerasa Tap para un volumen final de 50µl). Las secuencias de los pares específicos de *primers*, para cada gen de interés se muestran en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 95°C por un minuto, alineamiento de 54 a 58°C dependiendo del primer, por un minuto y elongación a 72°C durante un minuto y la extensión final fue a 74°C por diez

minutos seguida por un lapso de enfriamiento a 4°C (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Valencia, CA, USA). El número de ciclos fue de 35 y los fragmentos resultantes de la amplificación fueron analizados mediante un gel de agarosa. El tamaño de los productos fue determinado mediante su comparación con un estándar de peso molecular de 100 pares de bases (Promega, Wisconsin, USA) (Avila-Gonzalez, Vega-Hernandez et al. 2015, Garcia-Castro, Garcia-Lopez et al. 2015, Avila-Gonzalez, Martinez-Alarcon et al. 2019). Asimismo, en la amplificación se incluyeron controles negativos en donde se omitía la enzima.

Gene	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Peso del producto (pb)
<i>OCT-4</i>	GAGGAGTCCCAGGACATCAA	GTCGTTTGGCTGAATACCTT	56.7	149
<i>NANOG</i>	TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT	GTTTCAGGATGTTGGAGAGTTC	53.9	286
<i>SOX2</i>	GCCGAGTGGAACTTTTGTC	GTTTCATGTGCGCGTAACTGT	55.3	264
<i>GAPDH</i>	AAGGTGAAGTCCGAGTCAAC	CCTGGAAGATGGTGATGGGAT	56.7	229

Tabla 1. Lista de *primers* utilizados y peso del producto.

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR correspondientes a los genes de pluripotencia, así como *GAPDH* fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% por electroforesis y purificados usando el Kit de recuperación Zymoclean™ Gel DNA (Zymo Research, CA, USA). Los fragmentos de DNA fueron cortados a partir del gel usando una navaja y fueron transferidos a un tubo de 1.5ml, en donde se les adicionó el reactivo ADB en una relación de 3 a 1 del gel de agarosa. Posteriormente, se incubaron 10 minutos a 40°C hasta que el gel se disolvió completamente y la solución resultante se transfirió a una columna de recolección *Zymo-Spin™* (Zymo Research), la cual se centrifugó por 60 segundos y se le adicionó 200µl de buffer de lavado de DNA. Para eluir el cDNA se adicionó 10µl de agua libre de DNAsas en la columna y se centrifugo durante 60 segundos. El cDNA fue enviado a la unidad de Proteómica del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México

para su clonación y secuenciación mediante el kit *BigDye termination sequencing kit* (Applied Biosystems, California, USA) usando un termociclador y secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias clonadas fueron comparadas con los números de acceso del *GenBank*.

qRT-PCR del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

La qRT-PCR se realizó siguiendo el protocolo previamente reportado (Garcia-Castro, Garcia-Lopez et al. 2015). Brevemente, la obtención del RNA total y cDNA, así como los parámetros de la RT-PCR, fueron ejecutados de la manera antes descrita. Las reacciones fueron efectuadas en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Valencia, CA, USA) usando el sistema KAPA SYBER FAST qPCR (KAPA Biosystem, Wilmington, MA, USA). Se realizaron rangos dinámicos para determinar el umbral de detección y la eficiencia de reacción para cada uno de los genes, utilizando la línea H9 (Anexos-1-4). Las veces de cambio relativo fueron determinados usando el logaritmo matemático $2^{-\Delta\Delta\Delta CT}$ (Anexo 5). Los niveles relativos de los genes blanco fueron normalizados por el nivel de RNAm de GAPDH.

Microscopia confocal del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

El tejido de cada una de las regiones se fijó con metanol durante 15 minutos a -20°C , seguido de 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. Posteriormente, fue embebido en Tissue-TeK (Sakura, CA, USA) y congelado a -80°C para realizar cortes histológicos de $10\mu\text{m}$ en un criostato (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Germany).

Se evaluó la identidad epitelial mediante un anticuerpo primario anti-E-cadherina (1:100) (BD Biosciences, CA, USA) hecho en ratón; mientras que para determinar la triada de pluripotencia se usaron los anticuerpos primarios anti-OCT-4 (1:200), anti-SOX-2 (1:500)

y anti-NANOG (1:500) (Abcam, CA, USA) todos ellos hechos en conejo, los cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente, se adicionaron anticuerpos secundarios acoplados a compuestos fluorescentes, Alexa fluor 488 y 568 (1:1000) (Invitrogene), mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI (1:100) (Invitrogene). De forma paralela, la línea celular H9 fue utilizada como control positivo para los factores de transcripción involucrados en la pluripotencia y finalmente se realizó una serie de controles negativos, los cuales consistieron en omitir el anticuerpo primario, en donde no hubo marca (resultados no mostrados).

Las imágenes de los tejidos de las distintas regiones de la membrana amniótica humana se adquirieron mediante un microscopio confocal META LSM 510 (ZEISS, Germany) usando un objetivo plan-neofluar (NA 0.75) para detectar Alexa Fluor 488, 568 y DAPI en modo secuencial por excitación de los diferentes láseres.

Aislamiento y cultivo de células del hEA de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Para obtener el cultivo de las hAEC, se realizó el protocolo descrito previamente en la literatura (Garcia-Castro, Garcia-Lopez et al. 2015). Brevemente, las distintas regiones de la membrana se incubaron por separado durante un primer periodo de 5 minutos y dos periodos subsecuentes de 40 minutos en tripsina/EDTA (Gibco®, ThermoFisher, Massachusetts USA) a 37°C. Posteriormente, se inactivó la enzima con medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco®, ThermoFisher, Massachusetts USA) y el tripsinizado de los últimos ciclos se centrifugó a 200 x g a 4°C. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo y filtrado mediante un separador celular con un límite de 100µm. Finalmente, se sembraron cajas de cultivo con una densidad de 30,000 células por cm² en medio de cultivo suplementado (DMEM, 10% suero fetal bovino, 1% de

aminoácidos no esenciales, 500 µl de mercaptoetanol 55 mM, 1% de antibiótico-antimicótico (Todos de Gibco®, ThermoFisher, Massachusetts USA), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Peprotech, New Jersey, USA), El medio se cambió cada tercer día y cuando el cultivo alcanzó el 90% de confluencia se realizó el pase celular.

Cultivo de las hESC

Como control positivo de hPSC, se utilizó la línea de hESC H9 (WA09), la cual fue obtenida de WiCell. Las colonias fueron mantenidas en condiciones convencionales, sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados, de acuerdo a condiciones previamente reportadas. (Avila-Gonzalez, Vega-Hernandez et al. 2015, Avila-Gonzalez, Martinez-Alarcon et al. 2019).

Inmunofluorescencia en hAEC de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Las células cultivadas *in vitro* de los pasajes 0, 1 y 2 fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como siguiente paso todas las muestras se permeabilizaron durante 45 minutos con albumina bovina y tritón al 5% y 0.3%, respectivamente. Se evaluó la identidad epitelial y la posible contaminación de otro tipo celular mediante un anticuerpo primario anti-E-cadherina (1:100) (BD Biosciences, CA, USA) hecho en ratón; mientras que para determinar la triada de pluripotencia se usaron los anticuerpos primarios anti-OCT-4 (1:200), anti-SOX-2 (1:500) y anti-NANOG (1:500) (Abcam, CA, USA) todos ellos hechos en conejo, los cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente, se adicionaron anticuerpos secundarios acoplados a compuestos fluorescentes, Alexa fluor 488 y 568 (1:1000) (Invitrogene), mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI (1:100) (Invitrogene). De forma paralela, la línea celular H9 fue utilizada

como control positivo para los factores de transcripción involucrados en la pluripotencia y finalmente se realizó una serie de controles negativos, los cuales consistieron en omitir el anticuerpo primario, en donde no hubo marca (resultados no mostrados).

Conteo celular

En los cultivos celulares, al final de cada pase (P0-P2), se tomaron microfotografías de inmunofluorescencia a través de un microscopio de Epi-fluorescencia invertido (Olympus IX-81, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara CCD (Hamamatsu, ORCA-Flash 2.8, Tokyo, Japan). Se determinó el número de células positivas para la triada de pluripotencia en nueve campos aleatorios provenientes de cinco experimentos independientes capturados con un objetivo 10X (NA 0.4). Para establecer la co-expresión de los marcadores, las imágenes fueron empalmadas usando el programa *Adobe Photoshop CC 2017* (Adobe Systems Inc., CA, USA). El porcentaje de células positivas para cada experimento fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación: % de células positivas = (número de células positivas a un marcador específico X 100) / número total de núcleos (positivos a DAPI).

Estadística

Los datos de expresión de los factores de transcripción fueron normalmente distribuidos y por lo tanto analizados por el análisis de varianza (ANOVA). Los datos obtenidos del porcentaje de factores de transcripción en los cultivos celulares fueron analizados por análisis de varianza en *Ranks* de *Kruskal-Wallis* de una vía, en caso de diferencias significativas se utilizó la prueba de *Tukey post hoc*. El análisis estadístico fue realizado usando el software *Sigma-Plot 12* (Systat Software Inc., CA, USA).

Resultados

Secuenciación masiva de RNAm del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Para cumplir el primer objetivo, se analizó la expresión diferencial de las 3 regiones de la membrana amniótica obtenidas después de la cesárea. El análisis demostró que 296, 88 y 4 genes fueron expresados diferencialmente cuando se comparó en tejido placentario vs refractario, refractario vs umbilical y placentario vs umbilical, respectivamente. De la primera confrontación 21 genes fueron regulados hacia la alta y 275 la baja. Por lo que se refiere a la segunda comparación, encontramos 80 genes regulados hacia la alta y 8 genes hacia la baja. Finalmente, la última equiparación arrojó que solo 4 genes eran regulados hacia la baja.

Para analizar aquellas vías/interacciones se utilizaron las listas de genes regulados diferencialmente y se realizó un análisis de enriquecimiento de genes (Gene Ontology Consortium). Los resultados nos arrojaron listas de vías e interacciones que se agruparon manualmente en temas principales o procesos biológicos generales.

De esta forma, al analizar la región placentaria vs refractaria, encontramos a la baja las categorías para organización de matriz extracelular, procesos metabólicos de organismos multicelulares, adhesión de sustrato celular, osificación, procesos del sistema muscular, morfogénesis de vasos sanguíneos, segregación de cromosoma, división nuclear mitótica, regulación de la actividad proteínica dependiente de ciclina, y desarrollo del sistema esquelético (Tabla 2).

"Gene ontology"	Valor-P	Genes
Proceso Biológico GO:0043062 Organización de la estructura extracelular	9.04E-09	COL5A2, COL11A1, COMP, EGFLAM, FBLN1, ITGA11, PHLDB1, FMOD, EGFL6, TNC, ITGA4, LAMA4, LOXL1, MMP2, COL5A3, VCAM1, ANTXR1, CREB3L1, CD44
Proceso Biológico GO:0044236 Proceso metabólico de organismos multicelulares	2.56E-06	COL5A2, COL11A1, COL15A1, F2R, ID1, MMP2, COL5A3, TGFB3, CREB3L1, MRC2
Proceso Biológico GO:0031589 Adhesión sustrato-célula	1.16E-05	EGFLAM, FBLN1, ITGA11, EGFL6, ID1, ITGA4, BCAM, COL5A3, THY1, VCAM1, VEGFC, ANTXR1, AJUBA, CD44
Proceso Biológico GO:0001503 Osificación	2.26E-05	CTHRC1, COL5A2, COL11A1, JAG1, FGFR2, ITGA11, TNC, TMEM119, ID1, IGFBP5, LRP4, MMP2, TGFB3, CREB3L1, MRC2
Proceso Biológico GO:0003012 Procesos del sistema muscular	5.62E-05	ADA, MYL9, HSPB6, CNN1, F2R, GPD1L, LMOD1, GDNF, ANXA6, IGFBP5, ACTA2, TPM2, SPHK1, MYOCD, AKAP6
Proceso Biológico GO:0048514 Morfogénesis de los vasos sanguíneos	5.82E-05	RAMP1, CHI3L1, COL15A1, JAG1, FGFR2, DDAH1, ID1, AQP1, MMP2, PRRX1, THBS2, THY1, VEGFC, SCG2, TEAD2, SPHK1, MYOCD
Proceso Biológico GO:0007059 Segregación de cromosomas	1.23E-04	PTTG2, CDCA5, SPC24, SGO1, ECT2, NUSAP1, PLK1, CDCA8, TOP2A, PSRC1, PRC1, PTTG1, CDC6
Proceso Biológico GO:0007067 División nuclear mitótica	1.64E-04	CDCA5, SPC24, SGO1, TPX2, NUSAP1, PLK1, CDCA8, PBK, PSRC1, CCNA2, PRC1, PKMYT1, PTTG1, CDK1, CDC6
Proceso Biológico GO:1904029 Regulación de la actividad de proteína de cinasa dependiente de ciclina	3.8E-04	PLK1, PSRC1, CCNA2, PKMYT1, MYOCD, CDC6
Proceso Biológico GO:0001501 Desarrollo del Sistema esquelético	4.92E-04	CHI3L1, COL5A2, COL11A1, COMP, FGFR2, HOXC4, HOXC6, TMEM119, MMP2, PRRX1, PDGFC, TBX3, TGFB3, WNT5B, CD44
Componente Celular GO:0005578 Matriz extracelular proteica	4.13E-10	CHI3L1, CTHRC1, COL5A2, COL11A1, COL15A1, COMP, EGFLAM, CILP2, FBLN1, GPC4, FMOD, EGFL6, TNC, LAMA4, LOXL1, MMP2, COL5A3, THBS2, TFPI2, WNT5B, WISP1, PAPLN
Componente Celular GO:0044420 Componente de matriz extracelular	3.01E-07	COL5A2, COL11A1, COL15A1, EGFLAM, FBLN1, EGFL6, TNC, LAMA4, LOXL1, COL5A3, THBS2
Función Molecular GO:0005201 Constituyente matriz extracelular estructural	3.4E-07	CHI3L1, COL5A2, COL11A1, COL15A1, COMP, FBLN1, LAMA4, COL5A3, TFPI2
Función Molecular GO:0005539 Unión a glicosaminoglicano	5.59E-06	COMP, EGFLAM, FGFR2, FMOD, MDK, COL5A3, PCOLCE, CXCL6, SOD3, THBS2, WISP1, CD44
Función Molecular GO:1901681 Unión de compuestos de azufre	5.96E-06	FST, COMP, GPC4, FGFR2, FMOD, GSTM3, MDK, COL5A3, PCOLCE, CXCL6, SOD3, THBS2, WISP1
Función Molecular GO:0005518 Unión a colágeno	1.13E-05	COMP, ITGA11, COL5A3, PCOLCE, ANTXR1, CD44, MRC2
Función Molecular GO:001968 Unión a fibronectina	2.11E-04	FBLN1, SSC5D, IGFBP5, ITGA4
Función Molecular GO:0001948 Unión a glicoproteína	2.29E-04	FST, COMP, GPC4, TNC, LDLR, COL5A3, TFRC
Función Molecular GO:0003779 Unión a actina	8.72E-04	CNN1, CNN2, CNN3, COTL1, DAAM2, LMOD1, ENAH, MARCKSL1, TAGLN, TPM2, ANTXR1, AJUBA, HOMER2
Función Molecular GO:0015026 Actividad co-receptora	1.09E-03	RAMP1, GPC4, ITGA4, NECTIN1
KEGG hsa04512 Interacción receptor-MEC	2.39E-02	COMP, ITGA11, TNC, ITGA4, LAMA4, THBS2, CD44
KEGG hsa04110 Ciclo celular	2.54E-02	PTTG2, PLK1, TGFB3, CCNA2, PKMYT1, PTTG1, CDK1, CDC6
KEGG hsa04510 Adhesión focal	2.54E-02	MYL9, COMP, ITGA11, TNC, ITGA4, LAMA4, PDGFC, THBS2, VEGFC, PIK3R3
KEGG hsa04151 Vía de señalización PI3K-Akt	2.82E-02	COMP, F2R, FGFR2, ITGA11, GNG11, TNC, ITGA4, LAMA4, PDGFC, THBS2, VEGFC, PIK3R3, CREB3L1

Tabla 2. "Gene ontology" (GO) Procesos biológicos, componentes celulares, función molecular y "KEGG" en términos de genes regulados hacia abajo en MAP vs MAR.

En contraste, la comparación de los datos de expresión del tejido de la región refractaria vs la umbilical, muestran una alta en las categorías de organización de la estructura extracelular, respuesta celular a estímulos de factor de crecimiento endotelial, morfogénesis de vasos sanguíneos, cascada de ERK1 y ERK2, desarrollo del tubo respiratorio, desarrollo del sistema esquelético, desarrollo del sistema respiratorio, desarrollo del sistema muscular, desarrollo del tejido conectivo y proliferación de fibroblastos (Tabla 3).

“Gene ontology”	Valor-P	Genes
Proceso biológico GO:0043062 Organización de estructura extracelular	3.65E-10	COMP, CTSK, FBLN1, FMOD, EGFL6, TNC, KDR, MFAP4, MMP2, PDGFRA, COL14A1, VTN, ANTXR1
Proceso biológico GO:0035924 Respuesta celular a estímulos del factor de crecimiento endotelial vascular	1.49E-05	GAS1, NR4A1, KDR, PDGFRA
Proceso biológico GO:0048514 Morfogénesis de vasos sanguíneos	2.01E-05	RAMP1, CHI3L1, NR4A1, AQP1, KDR, MMP2, PDGFRA, PRRX1, CYSLTR2, SPHK1
Proceso biológico GO:0070371 Cascada ERK1 y ERK2	6.48E-05	CHI3L1, F2R, FBLN1, IGF1, KDR, PDGFRA, CYSLTR2
Proceso biológico GO:0030323 Desarrollo del tubo respiratorio	6.7E-05	CHI3L1, TNC, IGFBP5, PDGFRA, WNT2B, PKDCC
Proceso biológico GO:0001501 Desarrollo del Sistema esquelético	1.05E-04	CHI3L1, COMP, FREM1, IGF1, MMP2, PDGFRA, PRRX1, WNT2B, PKDCC
Proceso biológico GO:0060541 Desarrollo del Sistema respiratorio	1.28E-04	CHI3L1, TNC, IGFBP5, PDGFRA, WNT2B, PKDCC
Proceso biológico GO:0003012 Proceso del sistema muscular	1.51E-04	MYL9, HSPB6, F2R, IGF1, IGFBP5, ACTA2, TPM2, SPHK1
Proceso biológico GO:0061448 Desarrollo del tejido conectivo	3.32E-04	CHI3L1, COMP, PRRX1, ACTA2, WNT2B, PKDCC
Proceso biológico GO:0048144 Proliferación de fibroblastos	3.55E-04	IGF1, AQP1, PDGFRA, SPHK1
Componente celular GO:0005578 Matriz extracelular proteica	2.09E-11	CHI3L1, COMP, FREM1, FBLN1, GPC4, FMOD, EGFL6, TNC, MFAP4, MMP2, COL14A1, VTN, WNT2B, TFPI2
Componente celular GO:0044420 Componente de matriz extracelular	3.25E-07	FREM1, FBLN1, EGFL6, TNC, MFAP4, COL14A1, VTN
Componente celular GO:0043292 Fibras contráctiles	1.31E-03	MYL9, PDLIM3, MMP2, ACTA2, TPM2
Función molecular GO:0005518 Unión a colágena	6.45E-06	COMP, CTSK, COL14A1, VTN, ANTXR1
Función molecular GO:0005201 Constituyente de matriz extracelular estructural	1.6E-05	CHI3L1, COMP, FBLN1, COL14A1, TFPI2
Función molecular GO:0001948 Unión a glicoproteína	6.25E-05	COMP, CTSK, GPC4, TNC, LDLR
Función molecular GO:0001968 Unión a fibronectina	1.46E-04	CTSK, FBLN1, IGFBP5
Función molecular GO:0008307 Constituyente estructural de musculo	6.95E-04	MYL9, PDLIM3, TPM2
KEGG hsa04151 Vía de señalización PI3K-Akt	1.99E-03	COMP, F2R, GNG11, NR4A1, TNC, IGF1, KDR, PDGFRA, VTN
KEGG hsa04510 Adhesión focal	2.32E-03	MYL9, COMP, TNC, IGF1, KDR, PDGFRA, VTN

Tabla 3. “Gene ontology” (GO) Procesos biológicos, componente celular, función molecular and “KEGG” en términos de genes regulados hacia arriba en MAR vs MAU.

Al analizar las vías de los genes expresados diferencialmente a partir de la base de datos “KEGG pathway”. Los datos muestran que hsa04512: Interacción del receptor-ECM, hsa04110:Ciclo celular, hsa04510:Adhesión focal y has04151: Vía de señalización PI3K-Akt fueron reguladas hacia la abaja con un “FDR cutoff” de <0.05 cuando se comparó el amnios placentario vs refractario, mientras que solo las vías hsa04151: Vía de señalización PI3K-Akt y hsa04510: Adhesión focal fueron regulados hacia la alza en el tejido refractario vs umbilical (Tabla 4).

Genes	DOWN			Genes	UP		
	KEGGID	KEGG Vía de señalización	Valor-P		KEGGID	KEGG Vía de señalización	Valor-P
MAP vs MAR 38	hsa04512	Interacción del receptor-MEC	2.39e-02	MAP vs MAR	ND	ND	ND
	hsa04110	Ciclo celular	2.54e-02		ND	ND	ND
	hsa04510	Adhesión focal	2.54e-02		ND	ND	ND
	hsa04151	Vía de señalización PI3K-Akt	2.82e-02		ND	ND	ND
MAP vs MAU	ND	ND	ND	MAP vs MAU	ND	ND	ND
MAR vs MAU	ND	ND	ND	MAR vs MAU 16	hsa04151	Vía de señalización PI3K-Akt	1.99e-03
	ND	ND	ND		hsa04510	Adhesión focal	2.32e-03

Tabla 4. Vías de señalización en términos de “KEGG” de genes regulados hacia arriba y hacia abajo en MAP vs MAR, MAP vs MAU y MAR vs MAU.

Finalmente, al comparar los genes asociados a la pluripotencia humanas, no se encontró ninguna diferencia (Tabla 5), lo mismo ocurrió para *OCT-4*, *SOX-2* y *NANOG*. Estos resultados sugieren que no existen cambios en los niveles de expresión de los factores de transcripción asociados a pluripotencia en las distintas regiones del tejido del hAE.

MAR vs MAU	MAP vs MAU	MAP vs MAR
ABTB1	ABTB1	ABTB1
AHCTF1	AHCTF1	AHCTF1
CCNK	CCNK	CCNK
CNOT1	CNOT1	CNOT1
E4F1	E4F1	E4F1
EDF1	EDF1	EDF1
EP300	EP300	EP300
FOXJ3	FOXJ3	FOXJ3
HCFC1	HCFC1	HCFC1
HIVEP3	HIVEP3	HIVEP3
ISL1	ISL1	ISL1
KEAP1	KEAP1	KEAP1
MBTD1	LDB2	LDB2
MED12	MBD1	MBTD1
MED13	MED12	MED12
MED13L	MED13	MED13
MED14	MED13L	MED13L
MED17	MED14	MED14
NFKB1	MED17	MED17
NFRKB	NFKB1	NFKB1
PITX1	NFRKB	NFRKB
SERTAD2	PITX1	PITX1
SPI1	SERTAD2	SERTAD2
SUB1	SPI1	SPI1
TADA2B	SUB1	SUB1
TAF7	TADA2B	TADA2B
TCEAL1	TAF7	TAF7
TFDP2	TCEAL1	TCEAL1
YY1	TFDP2	TFDP2
ZFP64	YY1	YY1
ZNF136	ZFP64	ZFP64
ZNF197	ZNF136	ZNF354A
ZNF35	ZNF197	ZNF136
ZNF354A	ZNF35	ZNF197
ZNF43	ZNF354A	ZNF35
ZNF513	ZNF43	ZNF513
ZNF711	ZNF513	ZNF546
ZNF786	ZNF546	ZNF711
ZNH1T3	ZNF711	ZNF786
	ZNF786	ZNHIT3
	ZNHIT3	

Tabla 5. Lista de genes asociados a pluripotencia humana expresados en las distintas regiones de la membrana amniótica humana.

Expresión de factores de transcripción asociados a pluripotencia en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Para corroborar los datos obtenidos por el análisis de RNA seq, determinamos la expresión del RNAm de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia en las distintas regiones del tejido de la membrana amniótica humana mediante la técnica de RT-PCR. Encontramos la expresión del RNAm de *OCT4*, *SOX-2* y *NANOG*, en todas las

regiones del tejido proveniente de la MAH. Los tamaños de los productos de la PCR (149, 264 y 286pb), así como las secuencias (datos no mostrados) fueron consistentes con las secuencias reportadas para *OCT-4/POU5F1* (número de acceso NM_002701), *SOX-2* (número de acceso NM_003106) y *NANOG* (número de acceso NM_024865) en la literatura. Al determinar la expresión relativa de dichos factores de transcripción con respecto a *GAPDH*, no encontramos ninguna diferencia significativa entre las regiones para ningún factor (Figura 10). Como control positivo utilizamos a la línea H9.

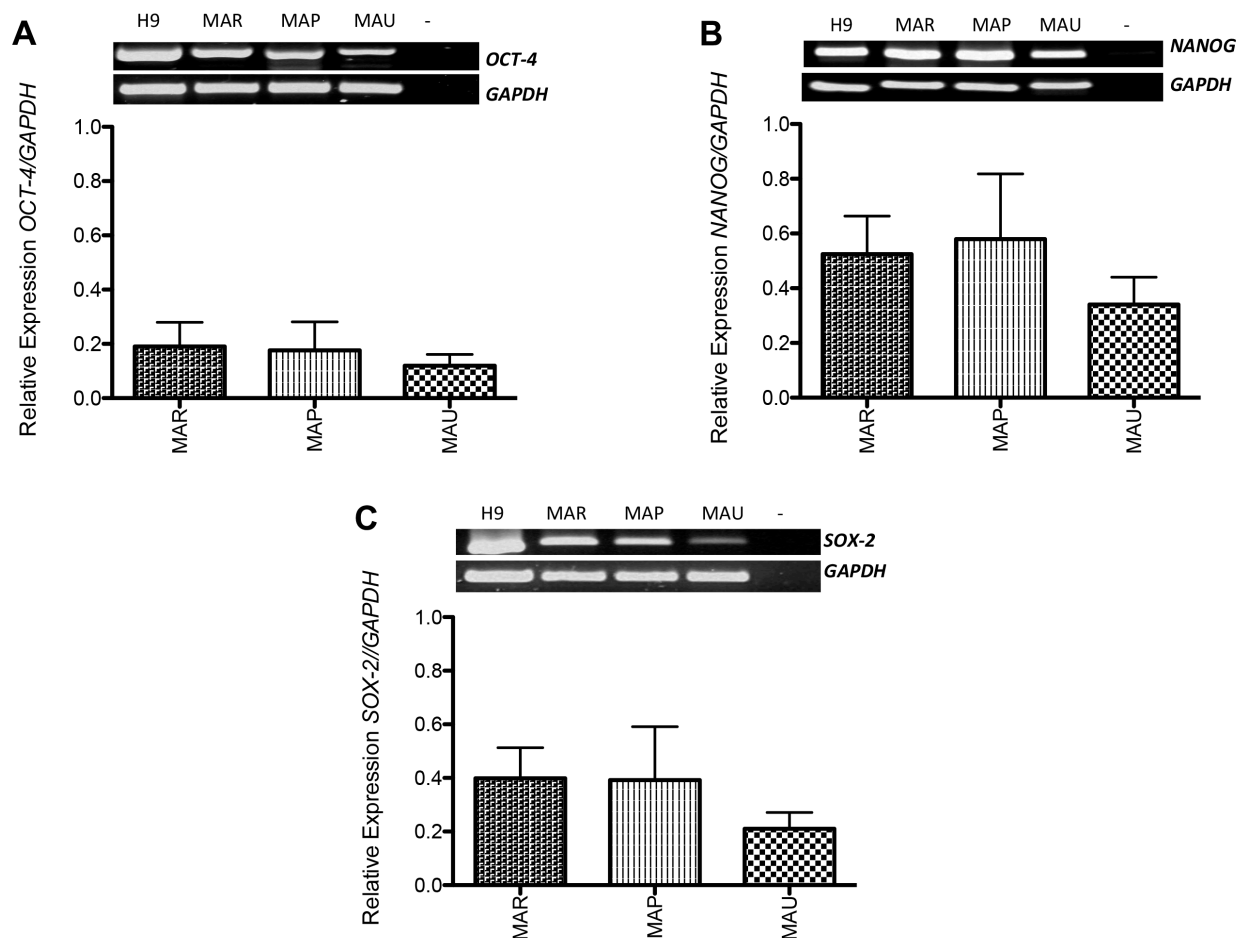


Figura 10. Expresión de factores asociados a pluripotencia *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* en tejido de las distintas regiones del amnios humano. Imágenes representativas de los productos de PCR en tiempo final en geles de agarosa con su análisis semi-cuantitativo para cada factor de transcripción (A, *OCT-4*; B, *NANOG*; C, *SOX-2*). H9, línea celular de hESC como control positivo; MAR, membrana amniótica refractaria, MAP, membrana amniótica placentaria; MAU, membrana amniótica umbilical. *GAPDH* fue usado como control constitutivo y para la normalización. n=10.

Debido a las limitaciones técnicas de la RT-PCR en punto final para hacer los resultados cuantitativos, procedimos a analizar nuestras muestras mediante la técnica de PCR en tiempo real. Para ello el valor de expresión relativa se normalizó a 1 utilizando a las hESC. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias significativas en la expresión para cada gen entre las distintas regiones analizadas (Figura 11).

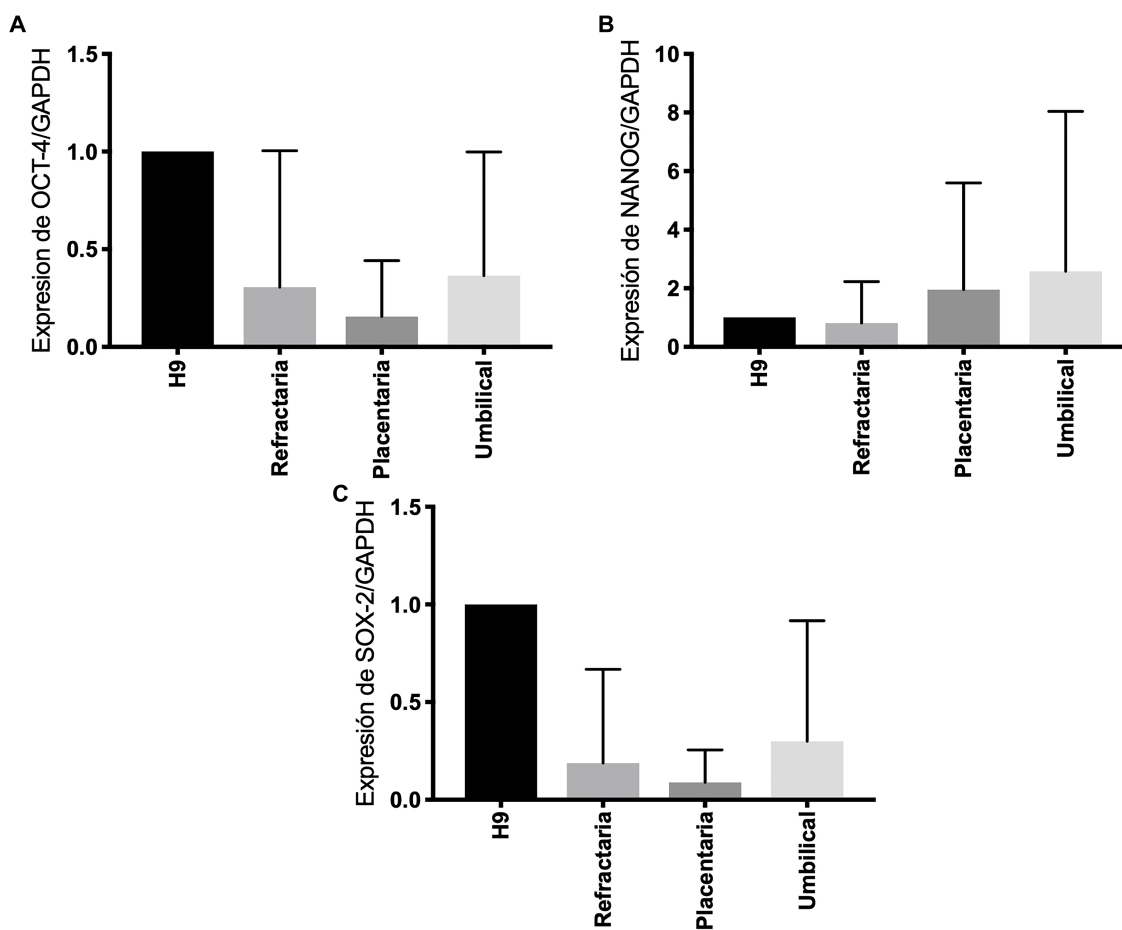


Figura 11. Análisis de PCR en tiempo real de los factores de transcripción asociados a pluripotencia *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* en las distintas regiones de la membrana amniótica humana. Las barras muestran los niveles de expresión de *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* relativos a GAPDH en tejido de las distintas regiones del amnios humano. La línea celular de hESC, H9 fue usada como calibrador; MAR, membrana amniótica refractaria, MAP, membrana amniótica placentaria; MAU, membrana amniótica umbilical. n=10.

Células positivas a factores de transcripción asociados a pluripotencia en células del tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Las distintas regiones de la membrana amniótica fueron positivas para los factores de transcripción *OCT-4*, *SOX-2* y *NANOG*. Sin embargo, la localización de *OCT-4* y *NANOG* fue encontrada principalmente en el citoplasma, mientras que la localización de *SOX-2* fue en el núcleo (Figuras 12-14). Para determinar que la marca era exclusiva en las hAEC se uso como control a la E-cadherina.

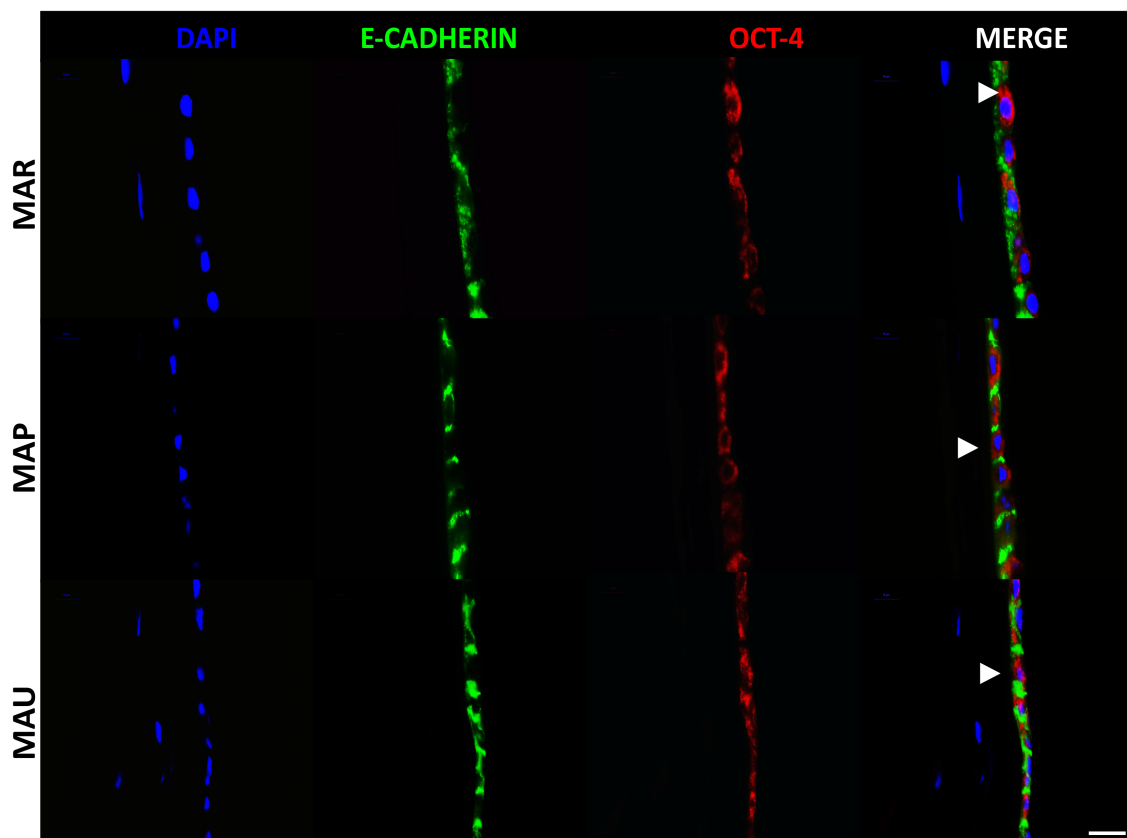


Figura 12. Marcaje de inmunofluorescencia para *OCT-4* en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. Micrografías confocales representativas del inmunomarcaje para E-cadherina (verde) que co-expresan en rojo con *OCT-4* en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. El núcleo fue detectado con DAPI (azul). La cabeza de flecha indica la distribución citoplasmática. MAR: Membrana amniótica refractaria; MAP: Membrana amniótica placentaria y MAU: Membrana amniótica umbilical.

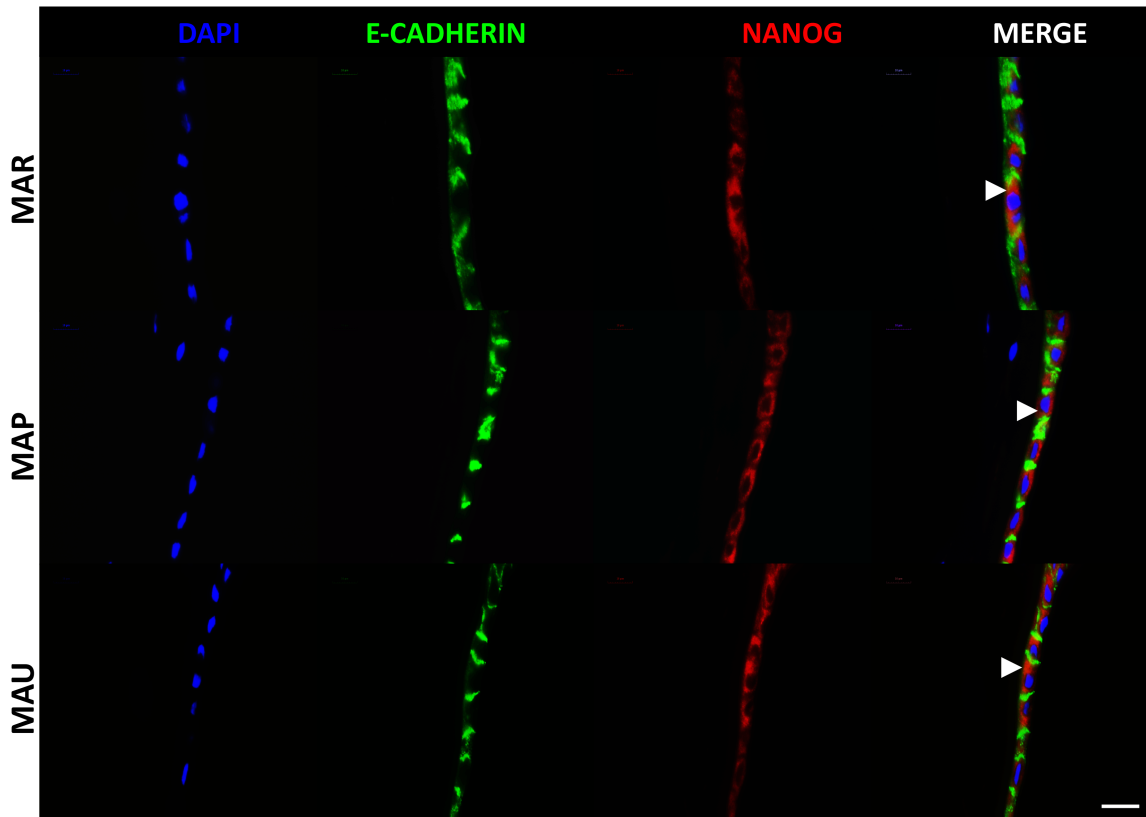


Figura 13. Marcaje de inmunofluorescencia para NANOG en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. Micrografías confocales representativas del inmunomarcaje para E-cadherina (verde) que co-expresan en rojo con NANOG en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. El núcleo fue detectado con DAPI (azul). La cabeza de flecha indica la distribución citoplasmática. MAR: Membrana amniótica refractaria; MAP: Membrana amniótica placentaria y MAU: Membrana amniótica umbilical.

Factores de transcripción asociados a pluripotencia en células en cultivo de las distintas regiones de la membrana amniótica humana

Debido a que no encontramos diferencias significativas en la triada de pluripotencia en las distintas regiones del tejido de la membrana amniótica humana averiguamos si las condiciones *in vitro* modificaban este patrón, para ello determinamos la expresión y presencia de *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* en hAEC cultivadas de las regiones refractaria y placentaria.

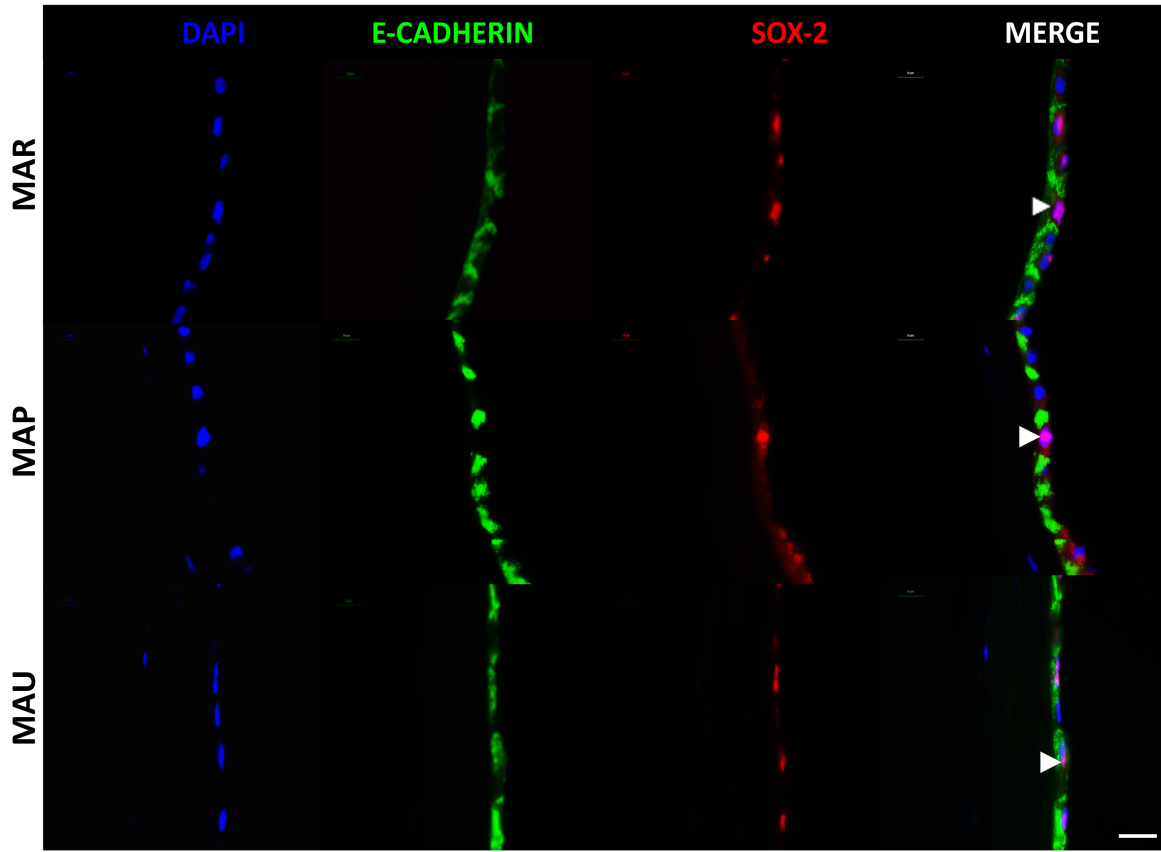


Figura 14. Marcaje de inmunofluorescencia para SOX-2 en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. Micrografías confocales representativas del inmunomarcaje para E-cadherina (verde) que co-expresan en rojo con SOX-2 en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana. El núcleo fue detectado con DAPI (azul). La cabeza de flecha indica la distribución nuclear. MAR: Membrana amniótica refractaria; MAP: Membrana amniótica placentaria y MAU: Membrana amniótica umbilical.

Al realizar el análisis de la expresión del RNAm de *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2*, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las hAEC derivadas de las regiones placentaria y refractaria en los diferentes pases de cultivo (P0-P2) (Figura 15).

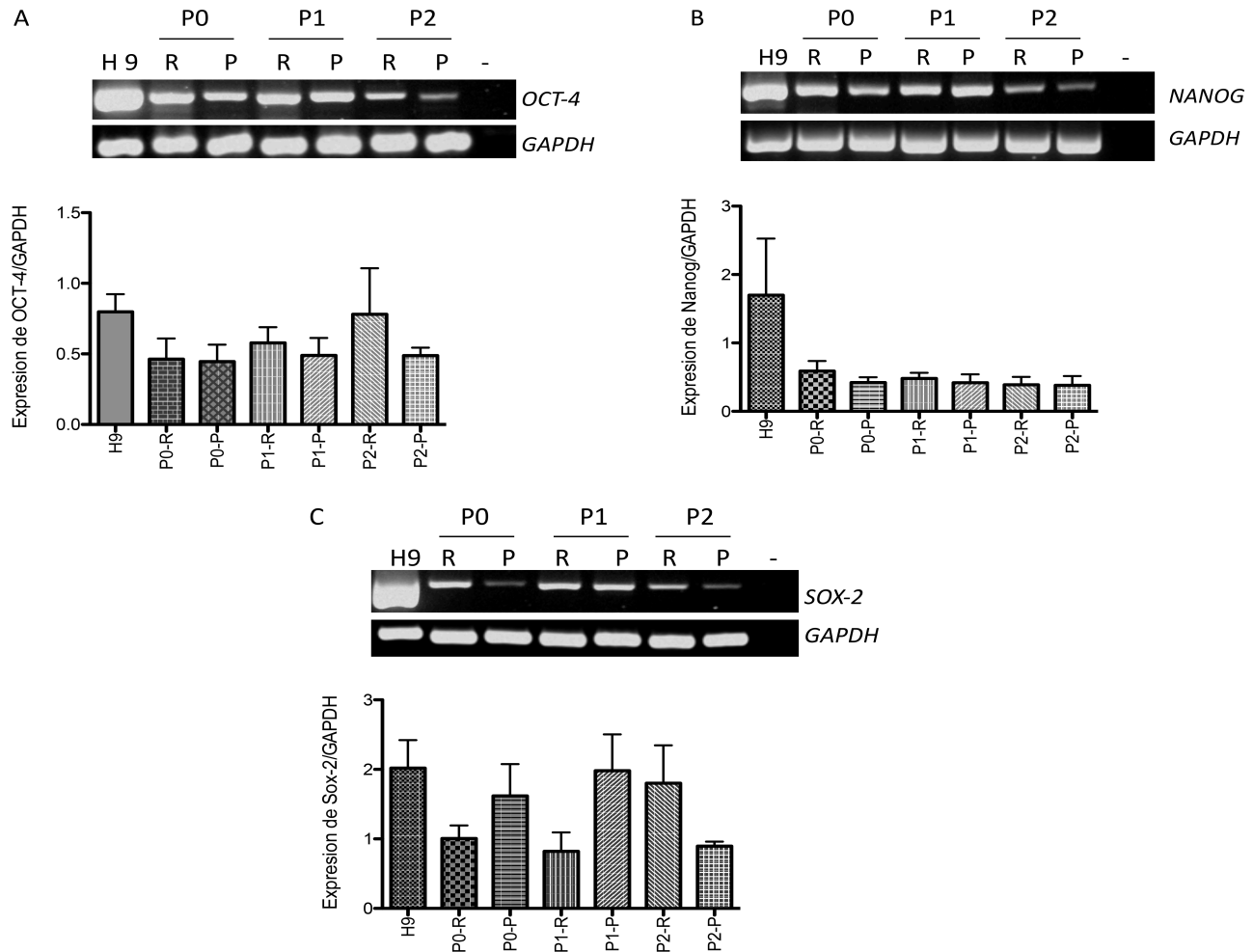


Figura 15. Expresión de factores asociados a pluripotencia *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* en células cultivadas *in vitro* de las distintas regiones del amnios humano. Imágenes representativas de los productos de PCR en tiempo final en geles de agarosa con su respectivo análisis semi-cuantitativo para cada factor de transcripción (A, *OCT-4*; B, *NANOG*; C, *SOX2*). H9, línea celular de hESC como control positivo; R, células de la membrana amniótica refractaria y P, células de la membrana amniótica placentaria. GAPDH fue usado como control constitutivo y para la normalización. n=10.

Tomando en cuenta los resultados en el tejido, los cuales mostraron la marca citoplasmática para *OCT-4* y *NANOG*, determinamos la localización de los factores de pluripotencia en los cultivos de hAEC en los pases 0-2. La localización de los factores de pluripotencia en cultivo fue encontrada en el núcleo, en el citoplasma o en ambos compartimientos (Figura 16).

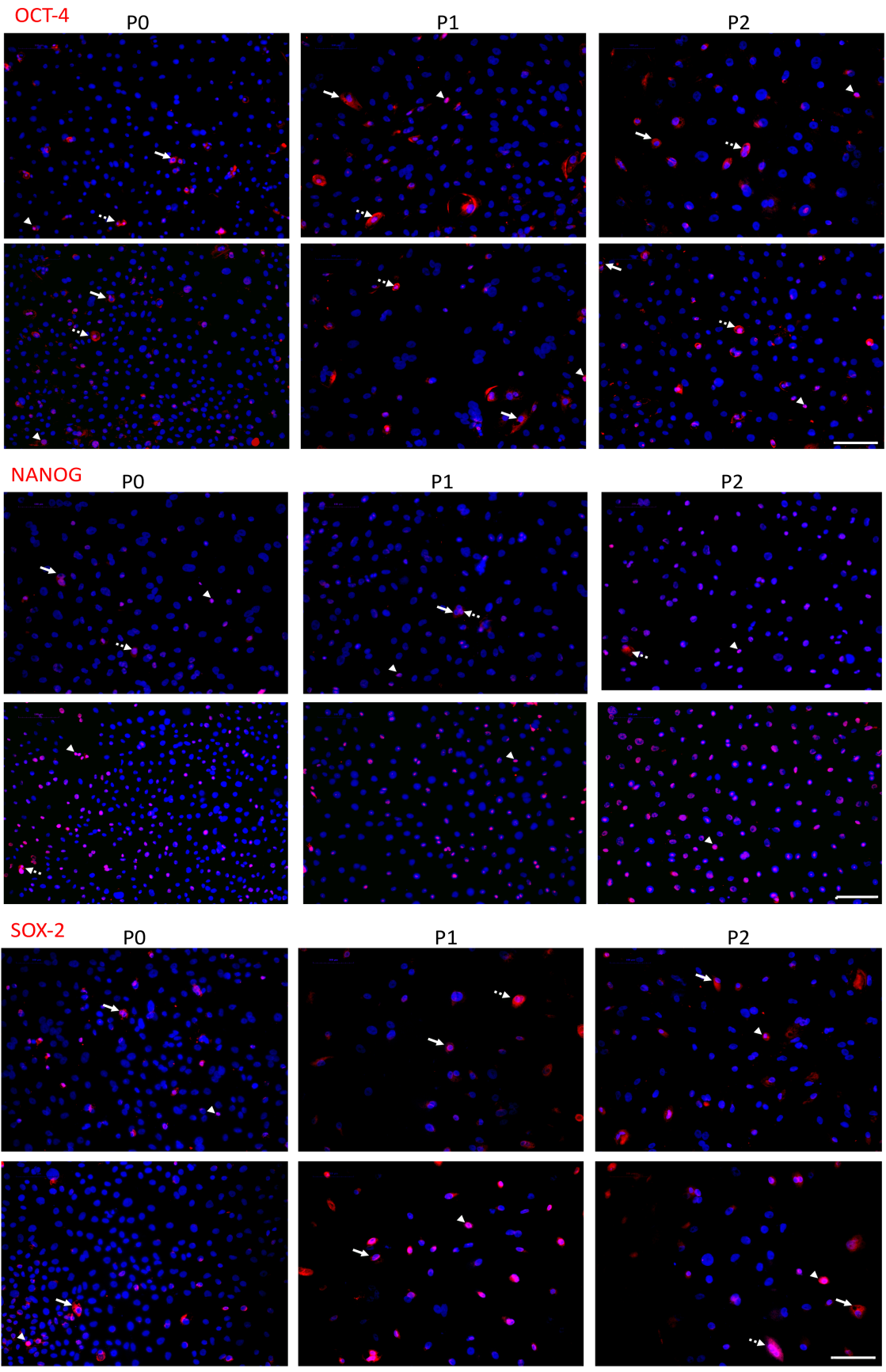


Figura 16. hAEC cultivadas in vitro en P0-P2 positivas a OCT-4, NANOG y SOX-2. Micrografías representativas de hAEC de las regiones refractaria (panel superior) y placentaria (panel inferior), inmunotefidas para OCT-4, NANOG y SOX-2 (rojo) y DAPI (azul). La localización de OCT-4, NANOG y SOX-2 es mostrada con las flechas; nuclear (cabeza de flecha), citoplasmática (flecha) o ambas (flecha discontinua).

Sin embargo, no encontramos diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células positivas para los factores de transcripción OCT-4 y SOX-2 entre las regiones refractaria y placentaria a través de los pases 0-2 (Figura 17). En cuanto a las células positivas para NANOG, encontramos diferencia significativa entre la marca nuclear y citoplasmática en ambas regiones; refractaria y placentaria de pase 0 (H=6, 2gl, P=0.025), 1 (H=7, 2gl, P=0.013) y 2 (H=7, 2gl, P=0.013) (Figura 17).

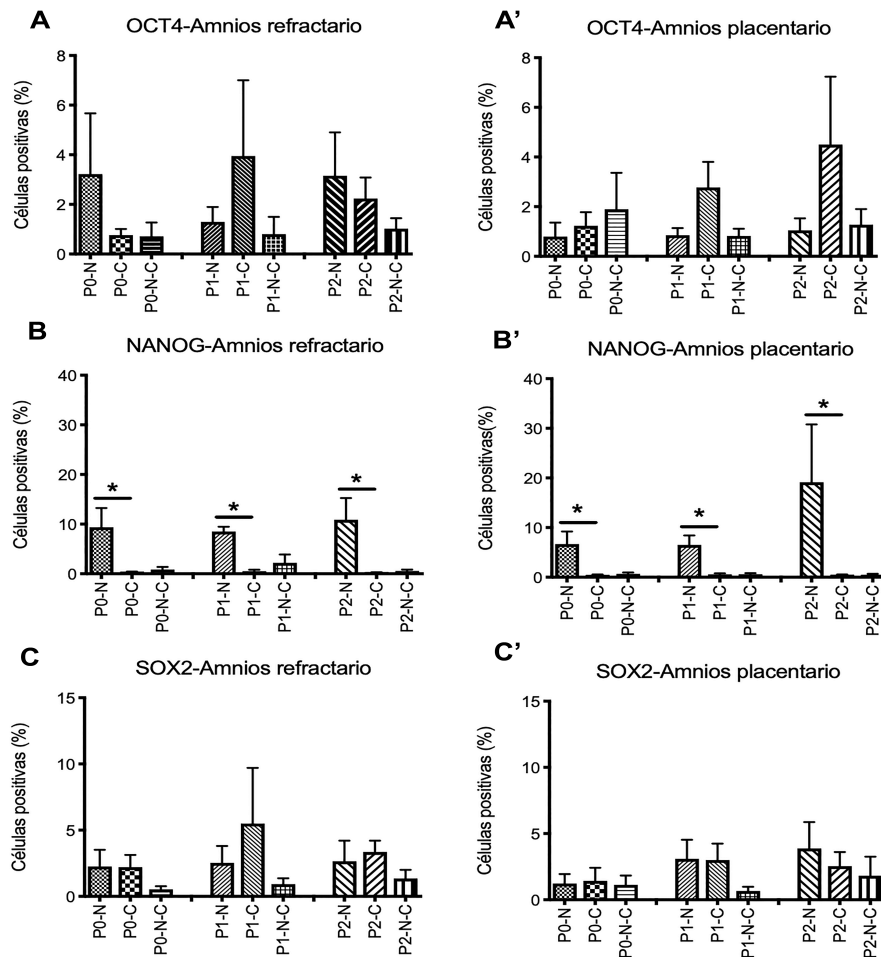


Figura 17. Cambios en la distribución subcelular de OCT-4 en hAEC cultivadas in vitro. Gráficas con el porcentaje de células positivas para OCT-4 en P0-P2 del amnios refractario (A) y placentario (B) con localización nuclear (N), citoplasmática o ambos para OCT-4 en PO-P2.

DISCUSION

Diversos reportes en la literatura han sugerido que las hAEC pueden ser usadas en la medicina regenerativa, debido a que poseen características únicas, como un fácil acceso, ya que son un producto de desecho posterior al parto; su uso no conlleva problemas ético-legales, solo se necesita el consentimiento informado de la madre para fines de investigación; no presentan moléculas de rechazo inmunológico, ya que no expresan las HLA de clase I y II sino la HLA-G, la cual le confiere un privilegio inmunológico; poseen moléculas antibacterianas y antivirales. Asimismo, uno de los principales atributos que tienen y las hacen sumamente atractivas es que son derivadas a partir del epiblasto antes de la gastrulación, lo que sugiere que estas células pueden mantener una población de células con características de PSC.

Raciocinios por los cuales, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de caracterizar a esta población tan singular de las membranas fetales. No obstante, a pesar de que los datos obtenidos por los grupos pioneros han puesto las bases en esta área, hay diversos aspectos que no se tomaron en cuenta y que podrían tener repercusiones en futuras investigaciones, si se plantea la posibilidad de utilizar estas células como una alternativa a las hESC o iPSC. Por ejemplo, en ninguno de esos reportes se especifica que región de la membrana amniótica fue analizada, noción que retoma importancia, ya que se ha reportado que la población del amnios humano no es homogénea.

De esta forma, uno de los primeros reportes en donde se describió esta heterogeneidad fue en los estudios del grupo de Ratcliffe, en donde se determinó la concentración de la proteína relacionada a la hormona paratiroidea mediante inmunoensayos en las distintas regiones del amnios al final del embarazo. Los autores encontraron una mayor concentración de la hormona en el amnios que cubre a la placenta, en comparación con la porción refractaria de mujeres sin trabajo de parto. No obstante, en

trabajo de parto, las concentraciones en la región refractaria eran correlacionadas con el intervalo entre la ruptura de la membrana y el trabajo de parto, lo cual sugiere que cada región del amnios puede tener un papel fisiológico en la unidad útero placentaria (Malak and Bell 1994, McLaren, Malak et al. 1999, McParland, Taylor et al. 2003). Asimismo, se reportó una expresión diferencial tanto para el RNAm como la proteína de acuaporina entre las regiones antes mencionadas de tejido de madres control y diabéticas, lo que sugiere que esta molécula puede tener una función distinta en el transporte celular, dependiendo de la región donde se localice (Bednar, Beardall, et al). Por otra parte, el grupo de Kim mediante la técnica de microarreglos reportaron que 839 genes, 56 procesos biológicos y 19 vías de señalización eran diferentes entre la región placentaria y refractaria del tejido amniótico obtenidas de membranas fetales de 37 semanas sin trabajo de parto (Han, Romero et al. 2008). Estos datos sugieren una expresión diferencial entre la región placentaria y refractaria y que dichos genes pueden ser funcionalmente relevantes y relacionados en las diferencias fisiológicas reportadas entre las regiones.

En este estudio y como una primera aproximación, realizamos la técnica de secuenciación masiva en tejido obtenido de las tres regiones del amnios, encontrando la expresión diferencial de 296, 88 y 4 genes al comparar la región placentaria versus refractaria, refractaria versus umbilical y placentaria versus umbilical, respectivamente. Al categorizar estas discrepancias en funciones biológicas de acuerdo al *Gene Ontology Consortium* encontramos las siguientes diferencias entre la región placentaria y refractaria; en las categorías de organización estructural extracelular, procesos metabólicos de organismos multicelulares, adhesión sustrato-célula, osificación, procesos del musculo esquelético, morfogénesis de vasos sanguíneos, segregación de cromosomas, división nuclear mitótica, regulación de la actividad de proteína cinasa dependiente de ciclina y del desarrollo del sistema esquelético. En contraste, al comparar la refractaria vs la umbilical, se

encontró diferencias en organización de estructuras extracelulares, respuesta celular al estímulo del factor de crecimiento vascular endotelial, morfogénesis de los vasos sanguíneos, cascada de ERK1 y 2, desarrollo del tubo respiratorio, del sistema esquelético, del sistema respiratorio, tejido conectivo y proliferación de fibroblastos. De esta forma, reportamos un número menor de genes, procesos biológicos y vías de señalización entre las zonas en comparación al estudio de Kim y cols. del 2008. Estas discrepancias pueden deberse a las diferentes metodologías para obtener los datos (microarreglos vs RNA seq), así como el método estadístico para obtener el análisis diferencial de los datos. A pesar de que la RNA-seq en comparación con la tecnología de microarreglos tiene un mayor umbral de detección de transcritos de baja expresión, lo que permite la identificación de variantes génicas y presentar un rango dinámico más amplio (Zhao, Fung-Leung et al. 2014). En el presente estudio se utilizaron cuatro programas estadísticos (DEseq2, edgeR, NOISeq y DESeq), lo que implica una valoración más rigurosa de los datos obtenidos debido a que únicamente los valores que eran estadísticamente significativos por todos los programas fueron los reportados.

No obstante, a pesar de las diferencias antes mencionadas, procesos biológicos como moléculas de adhesión celular, interacción receptor-matriz extracelular y adhesión focal en ambos trabajos se reportaron diferencias entre las regiones. De esta forma, los datos obtenidos en este estudio obtenidos por una técnica de última generación concuerdan con los datos en la literatura donde se sugiere que la población del hAE a término no es una población homogénea.

Posteriormente nos enfocamos a ver si esa heterogeneidad se conservaba para la pluripotencia. Motivo por el cual, analizamos la expresión de RNA y proteína de la triada de factores pluripotentes en las distintas porciones de la membrana amniótica del tejido y en células *in vitro* del hAE.

Como primera aproximación, identificamos si existía una expresión diferencial en el tejido de genes involucrados en la pluripotencia, así como de OCT-4, NANOG y SOX-2 a través de la técnica de secuenciación masiva de RNA. No obstante, no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en las distintas regiones del tejido de la membrana amniótica humana.

Para validar estos resultados, determinamos la expresión del RNA de la triada de pluripotencia, encontrando la expresión de los 3 factores en las 3 regiones del tejido amniótico. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias significativas para ningún factor o región (Fig. 10).

Asimismo, corroboramos que los productos de PCR eran consistentes con las secuencias reportadas para los transcritos involucrados en la pluripotencia. Debido a que en la literatura se ha reportado, que el gen de OCT4 puede generar tres isoformas de mRNA; OCT4A, OCT4B y OCT4B1 por “*splicing*” alternativo y cuatro isoformas de proteína; OCT4A, OCT4B-265, OCT4B190 y OCT4B-164 por “*splicing*” o inicio de la traducción alternativa (Gao, Wei et al. 2012) de las cuales, la única asociada a pluripotencia es la isoforma 4A (Shi and Jin 2010). Situación que cobra mayor importancia debido a que uno de los primeros trabajos en reportar la expresión de OCT-4, en el tejido de la MA la secuencia de *primers* que utilizaron para la PCR reconocía solo a la variante B (NM_001159542.1) (Ilancheran, Michalska et al. 2007). Por otra parte, debido a que la PCR en punto final es semicuantitativa, realizamos PCR en tiempo real para tener una mejor sensibilidad en la detección de los transcritos. Sin embargo, tampoco observamos diferencia alguna (Fig. 11).

Posteriormente, analizamos a nivel de proteína, la presencia de la triada de pluripotencia en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica, encontrando que las tres regiones de la membrana amniótica expresan el “core” de pluripotencia (OCT4, NANOG y SOX-2). Nuestros resultados muestran que las células positivas, se encuentran

distribuidas en todo el tejido del hAE. No obstante, observamos que la marca para OCT-4 y NANOG se encuentra específicamente en el citoplasma, mientras que la marca de SOX-2 se encuentra en el núcleo (Figuras 12-14). En la literatura, solo existe dos reportes de la localización de células positivas a OCT-4 en tejido de la membrana amniótica. En el primero, los autores identificaron células positivas a dicho factor de transcripción específicamente en la capa del hAE, a las cuales, clasificaron en subgrupos, de acuerdo a la intensidad de expresión de la proteína en: fuerte, moderado, bajo y negativo. Sin embargo, no mencionan nada con respecto a la localización celular (Tomoko Echigoya 2008).

El segundo, identificó la presencia de la proteína de OCT-4 y SOX-2 en el tejido de la membrana amniótica. Ellos detectaron OCT-4 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las hAEC de distintas regiones disecadas, de acuerdo a su posición con respecto al cordón umbilical; central (cercana al cordón), intermedia (media), periférica y refractaria. Asimismo, detectaron OCT-4 en las cuatro áreas de la membrana amniótica. Por lo que se refiere a SOX-2, reportaron su expresión a nivel citoplasmático en todas las áreas, tanto en hAEC como en células estromales mesénquimales de amnios (Centurione, Passaretta et al. 2018). A diferencia de estos reportes, este estudio es el primero en evaluar la triada de pluripotencia OCT-4, SOX-2 y NANOG en tejido de las regiones refractaria, placentaria y umbilical de la membrana amniótica humana.

Debido a que las SC antes de poder ser consideradas en la medicina regenerativa se debe de estandarizar los protocolos de amplificación *in vitro*, los cuales no deben de afectar las características biológicas nativas de las poblaciones celulares de su nicho. Por tal motivo, determinamos la triada de pluripotencia en células *in vitro* de las regiones refractaria y placentaria. Debido al bajo número de células que eran obtenidas de la región umbilical, no nos permitió su posterior análisis.

Para ello, los cultivos fueron mantenidos en cultivo hasta el pase 2 y analizamos la expresión del RNAm de OCT-4, NANOG y SOX-2. Encontramos que las hAEC de las distintas regiones analizadas, expresan los tres factores de transcripción a través de todos los pases. Sin embargo, cuando realizamos el análisis de cada uno de los factores, no encontramos diferencia significativa en ninguna de las condiciones (Fig. 15).

De manera interesante, con respecto a la proteína, encontramos tres subpoblaciones; 1) células positivas solamente en núcleo, 2) citoplasma y 3) ambos compartimentos. Comparando las células positivas para los factores de transcripción OCT-4 y SOX-2 entre las distintas regiones analizadas y subgrupos, no encontramos diferencia significativa (Fig. 17).

Se ha reportado que deben actuar de manera cooperativa los factores de transcripción en el núcleo para dirigir la expresión específica de genes involucrados en la pluripotencia (Takahashi, Tanabe et al. 2007). No obstante, en los últimos años se ha descrito la traslocación de estos del núcleo al citoplasma y viceversa, mediante señales de localización nuclear (NLSs, por sus siglas en inglés *nuclear localization signals*), de exportación nuclear (NESs, por sus siglas en inglés *nuclear export signals*) y modificaciones pos-traduccionales (Yang, Cai et al. 2014), con lo cual pueden regular de una manera más estricta su función en la diferenciación celular y desarrollo del organismo.

De esta manera, en la línea P19 de teratocarcinoma de ratón, se ha reportado que una mutación en la NLS en el dominio homeobox de OCT-4, induce la localización citoplasmática de la proteína, lo que promueve la diferenciación celular hacia trofoblasto (Pan, Qin et al. 2004). Por otra parte, en mESC se han identificado dos NLS situadas en el dominio HMG de SOX-2, que al ser modificadas producen la pérdida de la capacidad de SOX-2 para interactuar con OCT-4, lo que ocasiona la diferenciación de las mESC a trofoectodermo, sugiriendo que las NLS no solo son necesarias para la localización nuclear

de SOX-2, sino también para mantener a las mESC en estado indiferenciado (Li, Pan et al. 2007). Asimismo, en el motivo homeobox de NANOG en el humano, se han identificado dos NLS y una NES. Las primeras son requeridas para su importación nuclear, mientras que la segunda se une a CRM1 (CRM1, por sus siglas en inglés *Chromosomal Maintenance 1*, además conocida como Exportina 1) para inducir su localización citoplasmática (Do, Lim et al. 2007, Park, Do et al. 2012).

Por lo que se refiere a las modificaciones postraduccionales, en las líneas F9 y NCCIT de carcinoma embrionario de ratón y humano, respectivamente, se ha identificado que la localización nuclear de OCT-4 es promovida por la cinasa AKT (Lin, Yang et al. 2012). Asimismo, los niveles de proteína de OCT-4 en hESC son regulados por WWP2, ya que promueve su degradación por el proteosoma (Xu, Wang et al. 2009). Otra modificación postraducciona que sufre OCT-4 es la sumoilación en la lisina 118, lo que incrementa su estabilidad en el núcleo (Wei, Scholer et al. 2007, Zhang, Liao et al. 2007). Por lo que se refiere a SOX-2, en mESC se ha reportado que la proteína p300/unida al elemento de respuesta cAMP (*p300/cAMP-response-elementa-binding-protein-binding protein, CBP*) acetila la lisina 75 (K75) de su NES, lo que incrementa su interacción con CRM1 y promueve su exportación nuclear (Baltus, Kowalski et al. 2009). De la misma manera, se ha reportado que la des acetilación de Sox-2 por la Sirtuina 1, está implicada en la reprogramación de células somática de ratón (Mu, Wang et al. 2015). En fibroblastos embrionarios de ratón, Sox-2 es fosforilado en Thr118 por Akt, lo que favorece, no solo su estabilidad, por bloqueo de la ubiquitinación, sino que además permite una reprogramación más eficiente (Jeong, Cho et al. 2010). En estos momentos en el laboratorio se están realizando ensayos para demostrar si estos mecanismos existen en las hAEC y con ello regular su pluripotencia en el cultivo celular.

Este es el primer estudio que reporta la triada de pluripotencia en conjunto tanto a nivel de RNAm y proteína, en tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica humana, así como en cultivo. Estos hallazgos sugieren que las células positivas a los marcadores de pluripotencia se encuentran distribuidos de manera homogénea en toda la membrana amniótica, probablemente debido a que las SC del hAE no necesitan un microambiente (nicho) especializado como se ha descrito para otras poblaciones de SC adultas, en donde yacen en regiones anatómicas especializadas, lo cual se podría explicar debido a que el amnios no tiene 2 componentes principales de un nicho que son los vasos sanguíneos (soporte nutricional) y las señales sistémicas y neurales que favorecen la movilización de las SC.

CONCLUSIONES

El tejido de las tres regiones de la membrana amniótica (refractaria, placentaria y umbilical) expresan y son positivas a OCT-4, NANOG y SOX-2.

La expresión cuantitativa de OCT-4, NANOG y SOX-2

La localización de OCT4 y NANOG en células positivas en el tejido de las distintas regiones de la membrana amniótica se encuentran principalmente en el citoplasma. A diferencia de SOX-2 que su localización fue nuclear.

Las hAEC aisladas de las regiones placentaria y umbilical expresan y son positivas A OCT-4, NANOG y SOX-2 en cultivo durante P0-P2.

No se encontraron diferencias en la expresión del RNAm para los tres factores antes mencionados tanto *in vivo* como *in vitro* al comparar las regiones del hAE

Encontramos tres subpoblaciones en las hAEC cultivadas *in vitro* de las regiones refractaria y placentaria; 1) células positivas solamente en núcleo o 2) citoplasma y en 3) ambos compartimentos.

Bibliografía

1

- Akle, C. A., M. Adinolfi, K. I. Welsh, S. Leibowitz and I. McColl (1981). "Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers." *Lancet* **2**(8254): 1003-1005.
- Allouba, M. H., A. M. ElGuindy, N. Krishnamoorthy, M. H. Yacoub and Y. E. Aguib (2015). "NaNog: A pluripotency homeobox (master) molecule." *Glob Cardiol Sci Pract* **2015**(3): 36.
- Andrews, P. W. (1988). "Human teratocarcinomas." *Biochim Biophys Acta* **948**(1): 17-36.
- Anokye-Danso, F., C. M. Trivedi, D. Jühr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. A. Epstein and E. E. Morrisey (2011). "Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency." *Cell Stem Cell* **8**(4): 376-388.
- Atlasi, Y., S. J. Mowla, S. A. Ziaee, P. J. Gokhale and P. W. Andrews (2008). "OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells." *Stem Cells* **26**(12): 3068-3074.
- Avila-Gonzalez, D., O. Martinez-Alarcon, G. Garcia-Lopez, N. E. Diaz-Martinez, G. Razo-Aguilera, M. Y. Valdespino-Vazquez, E. R. Moreno-Verduzco, E. Vega-Hernandez, J. C. Regalado-Hernandez, J. F. De la Jara-Diaz, A. Molina-Hernandez, H. Flores-Herrera, W. Portillo and N. F. Diaz (2019). "Establishment of human embryonic stem cell line Amicqui-2 using poor-quality embryos from Mexican population." *Stem Cell Res* **34**: 101364.
- Avila-Gonzalez, D., E. Vega-Hernandez, J. C. Regalado-Hernandez, J. F. De la Jara-Diaz, I. L. Garcia-Castro, A. Molina-Hernandez, E. R. Moreno-Verduzco, G. Razo-Aguilera, H. Flores-Herrera, W. Portillo, N. E. Diaz-Martinez, G. Garcia-Lopez and N. F. Diaz (2015). "Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos." *Stem Cell Res* **15**(2): 322-324.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian and R. Lovell-Badge (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." *Genes Dev* **17**(1): 126-140.
- Baltus, G. A., M. P. Kowalski, H. Zhai, A. V. Tutter, D. Quinn, D. Wall and S. Kadam (2009). "Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells." *Stem Cells* **27**(9): 2175-2184.
- Banerjee, A., A. Weidinger, M. Hofer, R. Steinborn, A. Lindenmair, S. Hennerbichler-Lugscheider, J. Eibl, H. Redl, A. V. Kozlov and S. Wolbank (2015). "Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane." *Placenta* **36**(11): 1329-1332.
- Barberi, T., M. Bradbury, Z. Dincer, G. Panagiotakos, N. D. Socci and L. Studer (2007). "Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells." *Nat Med* **13**(5): 642-648.
- Bednar, A. D., M. K. Beardall, R. A. Brace and C. Y. Cheung (2015). "Differential expression and regional distribution of aquaporins in amnion of normal and gestational diabetic pregnancies." *Physiol Rep* **3**(3).
- Benirschke, K. (2000). *Pathology of the Human Placenta*, Springer-Verlag New York.
- Bieberich, E., J. Silva, G. Wang, K. Krishnamurthy and B. G. Condie (2004). "Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants." *J Cell Biol* **167**(4): 723-734.
- Booth, H. A. and P. W. Holland (2004). "Eleven daughters of NANOG." *Genomics* **84**(2): 229-238.
- Bourne, G. L. (1960). "The microscopic anatomy of the human amnion and chorion." *Am J Obstet Gynecol* **79**: 1070-1073.
- Brons, I. G., L. E. Smithers, M. W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S. M. Chuva de Sousa Lopes, S. K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R. A. Pedersen and L. Vallier (2007). "Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos." *Nature* **448**(7150): 191-195.
- Brown, S., A. Teo, S. Pauklin, N. Hannan, C. H. Cho, B. Lim, L. Vardy, N. R. Dunn, M. Trotter, R. Pedersen and L. Vallier (2011). "Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors." *Stem Cells* **29**(8): 1176-1185.
- Buganim, Y., D. A. Faddah and R. Jaenisch (2013). "Mechanisms and models of somatic cell reprogramming." *Nat Rev Genet* **14**(6): 427-439.
- Cartwright, P., C. McLean, A. Sheppard, D. Rivett, K. Jones and S. Dalton (2005). "LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism." *Development* **132**(5): 885-896.

Centurione, L., F. Passaretta, M. A. Centurione, S. Munari, E. Vertua, A. Silini, M. Liberati, O. Parolini and R. Di Pietro (2018). "Mapping of the Human Placenta: Experimental Evidence of Amniotic Epithelial Cell Heterogeneity." *Cell Transplant* **27**(1): 12-22.

Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie and A. Smith (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* **113**(5): 643-655.

Cheng, A. M., T. M. Saxton, R. Sakai, S. Kulkarni, G. Mbamalu, W. Vogel, C. G. Tortorice, R. D. Cardiff, J. C. Cross, W. J. Muller and T. Pawson (1998). "Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation." *Cell* **95**(6): 793-803.

Cho, H. J., C. S. Lee, Y. W. Kwon, J. S. Paek, S. H. Lee, J. Hur, E. J. Lee, T. Y. Roh, I. S. Chu, S. H. Leem, Y. Kim, H. J. Kang, Y. B. Park and H. S. Kim (2010). "Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation." *Blood* **116**(3): 386-395.

Choo, S. Y. (2007). "The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications." *Yonsei Med J* **48**(1): 11-23.

Chung, S., B. S. Shin, E. Hedlund, J. Pruszk, A. Ferree, U. J. Kang, O. Isacson and K. S. Kim (2006). "Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation." *J Neurochem* **97**(5): 1467-1480.

Damjanov, I. (1993). "Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis." *Int J Dev Biol* **37**(1): 39-46.

Dawson, D. W., O. V. Volpert, P. Gillis, S. E. Crawford, H. Xu, W. Benedict and N. P. Bouck (1999). "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis." *Science* **285**(5425): 245-248.

Dawson, M. A., A. J. Bannister, B. Gottgens, S. D. Foster, T. Bartke, A. R. Green and T. Kouzarides (2009). "JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin." *Nature* **461**(7265): 819-822.

de Wert, G. and C. Mummery (2003). "Human embryonic stem cells: research, ethics and policy." *Hum Reprod* **18**(4): 672-682.

DeBoever, C., H. Li, D. Jakubosky, P. Benaglio, J. Reyna, K. M. Olson, H. Huang, W. Biggs, E. Sandoval, M. D'Antonio, K. Jepsen, H. Matsui, A. Arias, B. Ren, N. Nariai, E. N. Smith, A. D'Antonio-Chronowska, E. K. Farley and K. A. Frazer (2017). "Large-Scale Profiling Reveals the Influence of Genetic Variation on Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* **20**(4): 533-546 e537.

Deglinerti, A., G. F. Croft, L. N. Pietila, M. Zernicka-Goetz, E. D. Siggia and A. H. Brivanlou (2016). "Self-organization of the in vitro attached human embryo." *Nature* **533**(7602): 251-254.

Deihim, T., G. Yazdanpanah and H. Niknejad (2016). "Different Light Transmittance of Placental and Reflected Regions of Human Amniotic Membrane That Could Be Crucial for Corneal Tissue Engineering." *Cornea* **35**(7): 997-1003.

Do, H. J., H. Y. Lim, J. H. Kim, H. Song, H. M. Chung and J. H. Kim (2007). "An intact homeobox domain is required for complete nuclear localization of human Nanog." *Biochem Biophys Res Commun* **353**(3): 770-775.

Enders, A. C., S. Schlafke and A. G. Hendrickx (1986). "Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey." *Am J Anat* **177**(2): 161-185.

Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**(5819): 154-156.

Evron, A., S. Goldman and E. Shalev (2011). "Human amniotic epithelial cells cultured in substitute serum medium maintain their stem cell characteristics for up to four passages." *Int J Stem Cells* **4**(2): 123-132.

Ferguson, J. E., 2nd, J. V. Gorman, D. E. Bruns, E. C. Weir, W. J. Burtis, T. J. Martin and M. E. Bruns (1992). "Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in human amnion and its association with labor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8384-8388.

Fukuda, H., J. Takahashi, K. Watanabe, H. Hayashi, A. Morizane, M. Koyanagi, Y. Sasai and N. Hashimoto (2006). "Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation." *Stem Cells* **24**(3): 763-771.

Gao, Y., X. Wang, J. Han, Z. Xiao, B. Chen, G. Su and J. Dai (2010). "The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B." *J Genet Genomics* **37**(7): 461-465.

Gao, Y., J. Wei, J. Han, X. Wang, G. Su, Y. Zhao, B. Chen, Z. Xiao, J. Cao and J. Dai (2012). "The novel function of OCT4B isoform-265 in genotoxic stress." *Stem Cells* **30**(4): 665-672.

Garcia-Castro, I. L., G. Garcia-Lopez, D. Avila-Gonzalez, H. Flores-Herrera, A. Molina-Hernandez, W. Portillo, E. Ramon-Gallegos and N. F. Diaz (2015). "Markers of Pluripotency in Human Amniotic Epithelial Cells and Their Differentiation to Progenitor of Cortical Neurons." *PLoS One* **10**(12): e0146082.

Garcia-Lopez, G., P. Flores-Espinosa and V. Zaga-Clavellina (2010). "Tissue-specific human beta-defensins (HBD)1, HBD2, and HBD3 secretion from human extra-placental membranes stimulated with Escherichia coli." *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 146.

Gonzalez, F., S. Boue and J. C. Izpisua Belmonte (2011). "Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte." *Nat Rev Genet* **12**(4): 231-242.

Griffiths, D. S., J. Li, M. A. Dawson, M. W. Trotter, Y. H. Cheng, A. M. Smith, W. Mansfield, P. Liu, T. Kouzarides, J. Nichols, A. J. Bannister, A. R. Green and B. Gottgens (2011). "LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease." *Nat Cell Biol* **13**(1): 13-21.

Hamazaki, T., S. M. Kehoe, T. Nakano and N. Terada (2006). "The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* **26**(20): 7539-7549.

Han, Y. M., R. Romero, J. S. Kim, A. L. Tarca, S. K. Kim, S. Draghici, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, P. Mittal, S. S. Hassan and C. J. Kim (2008). "Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion." *Biol Reprod* **79**(5): 954-961.

Hentze, H., P. L. Soong, S. T. Wang, B. W. Phillips, T. C. Putti and N. R. Dunn (2009). "Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies." *Stem Cell Res* **2**(3): 198-210.

Herr, W. and M. A. Cleary (1995). "The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain." *Genes Dev* **9**(14): 1679-1693.

Hirai, H., P. Karian and N. Kikyo (2011). "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor." *Biochem J* **438**(1): 11-23.

Ho, L., E. L. Miller, J. L. Ronan, W. Q. Ho, R. Jothi and G. R. Crabtree (2011). "esBAF facilitates pluripotency by conditioning the genome for LIF/STAT3 signalling and by regulating polycomb function." *Nat Cell Biol* **13**(8): 903-913.

Hou, Y., Q. Huang, T. Liu and L. Guo (2008). "Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(9): 830-839.

Ilancheran, S., A. Michalska, G. Peh, E. M. Wallace, M. Pera and U. Manuelpillai (2007). "Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential." *Biol Reprod* **77**(3): 577-588.

Illmensee, K. and L. C. Stevens (1979). "Teratomas and chimeras." *Sci Am* **240**(4): 120-132.

Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." *Cell* **132**(4): 567-582.

Jeong, C. H., Y. Y. Cho, M. O. Kim, S. H. Kim, E. J. Cho, S. Y. Lee, Y. J. Jeon, K. Y. Lee, K. Yao, Y. S. Keum, A. M. Bode and Z. Dong (2010). "Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells." *Stem Cells* **28**(12): 2141-2150.

Ji, J., S. H. Ng, V. Sharma, D. Neculai, S. Hussein, M. Sam, Q. Trinh, G. M. Church, J. D. McPherson, A. Nagy and N. N. Batada (2012). "Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells." *Stem Cells* **30**(3): 435-440.

Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg and G. Q. Daley (2010). "Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells." *Nature* **467**(7313): 285-290.

Kjaergaard, N., M. Hein, L. Hyttel, R. B. Helmig, H. C. Schonheyder, N. Ulbjerg and H. Madsen (2001). "Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **94**(2): 224-229.

Kubo, M., Y. Sonoda, R. Muramatsu and M. Usui (2001). "Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(7): 1539-1546.

Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S. Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji and T. Tada (2005). "Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2475-2485.

Lee, Y. J. and I. V. Baskakov (2013). "The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation." J Neurochem **124**(3): 310-322.

Li, J., G. Pan, K. Cui, Y. Liu, S. Xu and D. Pei (2007). "A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophoblast differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells." J Biol Chem **282**(27): 19481-19492.

Lim, R. (2017). "Concise Review: Fetal Membranes in Regenerative Medicine: New Tricks from an Old Dog?" Stem Cells Transl Med **6**(9): 1767-1776.

Lin, Y., Y. Yang, W. Li, Q. Chen, J. Li, X. Pan, L. Zhou, C. Liu, C. Chen, J. He, H. Cao, H. Yao, L. Zheng, X. Xu, Z. Xia, J. Ren, L. Xiao, L. Li, B. Shen, H. Zhou and Y. J. Wang (2012). "Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells." Mol Cell **48**(4): 627-640.

Malak, T. M. and S. C. Bell (1994). "Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site." Br J Obstet Gynaecol **101**(5): 375-386.

Malak, T. M., C. D. Ockleford, S. C. Bell, R. Dalgleish, N. Bright and J. Macvicar (1993). "Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes." Placenta **14**(4): 385-406.

Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.

Martin, M. J., A. Muotri, F. Gage and A. Varki (2005). "Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid." Nat Med **11**(2): 228-232.

Matin, M. M., J. R. Walsh, P. J. Gokhale, J. S. Draper, A. R. Bahrami, I. Morton, H. D. Moore and P. W. Andrews (2004). "Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells." Stem Cells **22**(5): 659-668.

McLaren, J., T. M. Malak and S. C. Bell (1999). "Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix." Hum Reprod **14**(1): 237-241.

McParland, P. C., D. J. Taylor and S. C. Bell (2003). "Mapping of zones of altered morphology and chorionic connective tissue cellular phenotype in human fetal membranes (amniochorion and decidua) overlying the lower uterine pole and cervix before labor at term." Am J Obstet Gynecol **189**(5): 1481-1488.

Miki, T. (2018). "Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells." Am J Reprod Immunol **80**(4): e13003.

Miki, T., T. Lehmann, H. Cai, D. B. Stolz and S. C. Strom (2005). "Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells." Stem Cells **23**(10): 1549-1559.

Millar, L. K., J. Stollberg, L. DeBuque and G. Bryant-Greenwood (2000). "Fetal membrane distention: determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term." Am J Obstet Gynecol **182**(1 Pt 1): 128-134.

Mitalipov, S. M., H. C. Kuo, J. D. Hennebold and D. P. Wolf (2003). "Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey." Biol Reprod **69**(6): 1785-1792.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-642.

Motedayyen, H., F. Fathi, M. Fasihi-Ramandi and R. Ali Taheri (2018). "The effect of lipopolysaccharide on anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines production of human amniotic epithelial cells." Reprod Biol **18**(4): 404-409.

Mu, W. L., Y. J. Wang, P. Xu, D. L. Hao, X. Z. Liu, T. T. Wang, F. Chen, H. Z. Chen, X. Lv and D. P. Liu (2015). "Sox2 Deacetylation by Sirt1 Is Involved in Mouse Somatic Reprogramming." Stem Cells **33**(7): 2135-2147.

Ng, P. M. and T. Lufkin (2011). "Embryonic stem cells: protein interaction networks." Biomol Concepts **2**(1-2): 13-25.

Niakan, K. K. and K. Eggan (2013). "Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse." Dev Biol **375**(1): 54-64.

Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.

Niknejad, H., H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi and A. M. Seifalian (2008). "Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering." Eur Cell Mater **15**: 88-99.

Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers and A. Smith (1998). "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3." Genes Dev **12**(13): 2048-2060.

Niwa, H., K. Ogawa, D. Shimosato and K. Adachi (2009). "A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells." Nature **460**(7251): 118-122.

Palmieri, S. L., W. Peter, H. Hess and H. R. Scholer (1994). "Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation." Dev Biol **166**(1): 259-267.

Pan, G., B. Qin, N. Liu, H. R. Scholer and D. Pei (2004). "Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation." J Biol Chem **279**(35): 37013-37020.

Pan, G. J. and D. Q. Pei (2003). "Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor nanog." Cell Res **13**(6): 499-502.

Park, S. W., H. J. Do, S. H. Huh, B. Sung, S. J. Uhm, H. Song, N. H. Kim and J. H. Kim (2012). "Identification of a putative nuclear export signal motif in human NANOG homeobox domain." Biochem Biophys Res Commun **421**(3): 484-489.

Pauklin, S. and L. Vallier (2015). "Activin/Nodal signalling in stem cells." Development **142**(4): 607-619.

Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). "Sox genes find their feet." Curr Opin Genet Dev **7**(3): 338-344.

Qi, X., T. G. Li, J. Hao, J. Hu, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina and G. Q. Zhao (2004). "BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6027-6032.

Saljo, K., A. Barone, J. Molne, L. Rydberg, S. Teneberg and M. E. Breimer (2017). "HLA and Histo-Blood Group Antigen Expression in Human Pluripotent Stem Cells and their Derivatives." Sci Rep **7**(1): 13072.

Schuldiner, M., J. Itskovitz-Eldor and N. Benvenisty (2003). "Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene." Stem Cells **21**(3): 257-265.

Shahbazi, M. N., A. Jedrusik, S. Vuoristo, G. Recher, A. Hupalowska, V. Bolton, N. N. M. Fogarty, A. Campbell, L. Devito, D. Ilic, Y. Khalaf, K. K. Niakan, S. Fishel and M. Zernicka-Goetz (2016). "Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues." Nat Cell Biol **18**(6): 700-708.

Shao, C., J. Sima, S. X. Zhang, J. Jin, P. Reinach, Z. Wang and J. X. Ma (2004). "Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 1758-1762.

Shao, Y., K. Taniguchi, K. Gurdziel, R. F. Townshend, X. Xue, K. M. A. Yong, J. Sang, J. R. Spence, D. L. Gumucio and J. Fu (2017). "Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche." Nat Mater **16**(4): 419-425.

Shevde, N. (2012). "Stem Cells: Flexible friends." Nature **483**(7387): S22-26.

Shi, G. and Y. Jin (2010). "Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency." Stem Cell Res Ther **1**(5): 39.

Solter, D., N. Skreb and I. Damjanov (1970). "Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma." Nature **227**(5257): 503-504.

Spits, C., I. Mateizel, M. Geens, A. Mertzanidou, C. Staessen, Y. Vandeskelde, J. Van der Elst, I. Liebaers and K. Sermon (2008). "Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **26**(12): 1361-1363.

Stevanovic, M., O. Zuffardi, J. Collignon, R. Lovell-Badge and P. Goodfellow (1994). "The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene." Mamm Genome **5**(10): 640-642.

Stevens, L. C. (1968). "The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs." J Embryol Exp Morphol **20**(3): 329-341.

Storm, M. P., B. Kumpfmüller, B. Thompson, R. Kolde, J. Vilo, O. Hummel, H. Schulz and M. J. Welham (2009). "Characterization of the phosphoinositide 3-kinase-dependent transcriptome in murine embryonic stem cells: identification of novel regulators of pluripotency." *Stem Cells* **27**(4): 764-775.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676.

Takeda, J., S. Seino and G. I. Bell (1992). "Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues." *Nucleic Acids Res* **20**(17): 4613-4620.

Tamagawa, T., I. Ishiwata and S. Saito (2004). "Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro." *Hum Cell* **17**(3): 125-130.

Taylor, C. J., E. M. Bolton, S. Pocock, L. D. Sharples, R. A. Pedersen and J. A. Bradley (2005). "Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching." *Lancet* **366**(9502): 2019-2025.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.

Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker and J. P. Hearn (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7844-7848.

Tomoko Echigoya, M. T., Hitoshi Hori, Fumiki Hirahara, Shigeru Yasumoto (2008). "Human Amniotic Epithelium as an Unlimited Source of Oct4-Expressing Totipotent Stem Cell Subset." *The Open Biotechnology Journal* **2**: 8.

Vallier, L., S. Mendjan, S. Brown, Z. Chng, A. Teo, L. E. Smithers, M. W. Trotter, C. H. Cho, A. Martinez, P. Rugg-Gunn, G. Brons and R. A. Pedersen (2009). "Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression." *Development* **136**(8): 1339-1349.

Vernekar, V., S. Velhal and A. Bandivdekar (2015). "Evaluation of cystatin C activities against HIV." *Indian J Med Res* **141**(4): 423-430.

Verrijzer, C. P., M. J. Alkema, W. W. van Weperen, H. C. Van Leeuwen, M. J. Strating and P. C. van der Vliet (1992). "The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains." *EMBO J* **11**(13): 4993-5003.

Wang, J., S. Rao, J. Chu, X. Shen, D. N. Lévassieur, T. W. Theunissen and S. H. Orkin (2006). "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." *Nature* **444**(7117): 364-368.

Wang, X. and J. Dai (2010). "Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology." *Stem Cells* **28**(5): 885-893.

Wang, X., Y. Zhao, Z. Xiao, B. Chen, Z. Wei, B. Wang, J. Zhang, J. Han, Y. Gao, L. Li, H. Zhao, W. Zhao, H. Lin and J. Dai (2009). "Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response." *Stem Cells* **27**(6): 1265-1275.

Wei, F., H. R. Scholer and M. L. Atchison (2007). "SUMOylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation." *J Biol Chem* **282**(29): 21551-21560.

Welham, M. J., M. P. Storm, E. Kingham and H. K. Bone (2007). "Phosphoinositide 3-kinases and regulation of embryonic stem cell fate." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 2): 225-228.

Xu, H., W. Wang, C. Li, H. Yu, A. Yang, B. Wang and Y. Jin (2009). "WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells." *Cell Res* **19**(5): 561-573.

Yang, J., N. Cai, F. Yi, G. H. Liu, J. Qu and J. C. Izpisua Belmonte (2014). "Gating pluripotency via nuclear pores." *Trends Mol Med* **20**(1): 1-7.

Yeo, J. C., J. Jiang, Z. Y. Tan, G. R. Yim, J. H. Ng, J. Goke, P. Kraus, H. Liang, K. A. Gonzales, H. C. Chong, C. P. Tan, Y. S. Lim, N. S. Tan, T. Lufkin and H. H. Ng (2014). "Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency." *Cell Stem Cell* **14**(6): 864-872.

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." *Science* **318**(5858): 1917-1920.

Zaga-Clavellina, V., G. Garcia-Lopez and P. Flores-Espinosa (2012). "Evidence of in vitro differential secretion of human beta-defensins-1, -2, and -3 after selective exposure to *Streptococcus agalactiae* in human fetal membranes." J Matern Fetal Neonatal Med **25**(4): 358-363.

Zaga-Clavellina, V., G. Garcia-Lopez, H. Flores-Herrera, A. Espejel-Nunez, A. Flores-Pliego, D. Soriano-Becerril, R. Maida-Claros, H. Merchant-Larios and F. Vadillo-Ortega (2007). "In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes." Reprod Biol Endocrinol **5**: 46.

Zhang, Z., B. Liao, M. Xu and Y. Jin (2007). "Post-translational modification of POU domain transcription factor Oct-4 by SUMO-1." FASEB J **21**(12): 3042-3051.

Zhao, S., W. P. Fung-Leung, A. Bittner, K. Ngo and X. Liu (2014). "Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells." PLoS One **9**(1): e78644.

Zhou, Q., H. Chipperfield, D. A. Melton and W. H. Wong (2007). "A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16438-16443.

Abreviaturas

Español

MAP: Membrana amniótica placentaria

MAR: Membrana amniótica refractaria

MAU: Membrana amniótica umbilical

MFH: Membranas fetales humanas

Inglés

CRM-1: Chromosomal Maintenance 1

dpc: days postcoitum

EC: Embryonal Carcinoma

EpiSC: Epiblast Stem Cells

ESC: Embryonic Stem Cells

hAEC: human Amniotic Epithelial Cells

hESC: human Embryonic Stem Cells

HLA: Human Leukocyte Antigen

ICM: Inner Cell Mass

iPSC: induced Pluripotent Stem Cells

LIF: Leukemia Inhibitor Factor

LMB: Leptomycin B

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

mESC: mouse Embryonic Stem Cells

NES: Nuclear Export Signals

NLS: Nuclear Localization Signals

PSC: Pluripotent Stem Cells

PTHrP: Parathyroid Hormone related Protein

SC: Stem Cells

SSEA: Stage Specific Embryonic Antigen

TE: Trofoectodermo

TRA: Tumor Rejection Antigen

Anexo- 1. Quantitation Report-GAPDH

Experiment Information

Run Name	Rango dinámico GAPDH
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	7.33

Quantitation Information

Threshold	0.2975
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.322 \cdot \text{CT} + 8.593)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.103 \cdot \log(\text{conc}) + 26.669$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 1.10005$
M	-3.10338
B	26.66875
R Value	0.99636
R^2 Value	0.99273
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

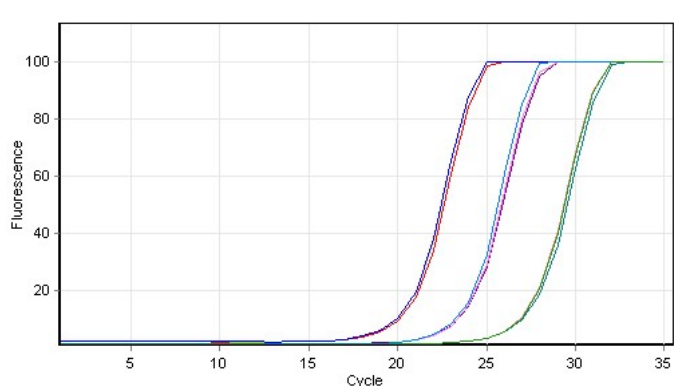
Messages

Message

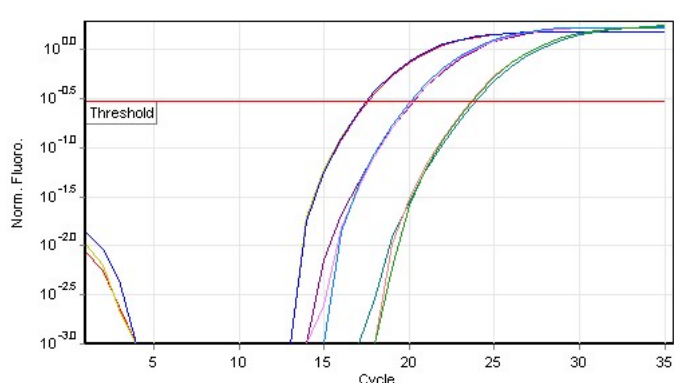
Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@56.75°, hold57secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 7095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

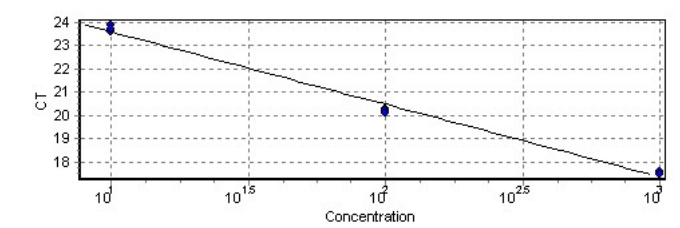
Raw Data For Cycling A.Green



Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	Red	1000	Standard	17.57		1000	855.755705365657
2	Yellow	1000	Standard	17.46		1000	926.509711088603
3	Blue	1000	Standard	17.47		1000	918.475769540009
4	Purple	100	Standard	20.25		100	117.098116196326
5	Pink	100	Standard	20.20		100	121.465283575943
6	Cyan	100	Standard	20.08		100	132.575403624182
7	Teal	10	Standard	23.86		10	8.04976768889892
8	Light Red	10	Standard	23.60		10	9.75537775691571
9	Light Green	10	Standard	23.67		10	9.27342244511122

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Melt Report-GAPDH

Experiment Information

Run Name	Rango dinámico GAPDH
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	7.33

Melt Information

Digital Filter	Light
Imported Analysis Settings	
Sample Page	Page 1
Temp. Threshold	0°
Threshold	3.30521

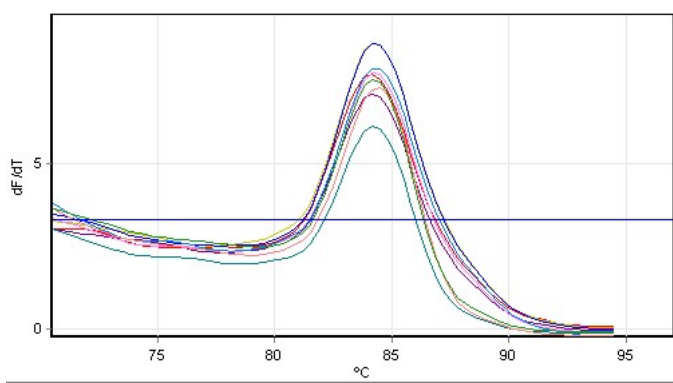
Messages

Message

Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@56.75°, hold57secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 7095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

Melt data for Melt A.Green



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1
1	Red	1000		84.0
2	Yellow	1000		84.3
3	Blue	1000		84.3
4	Purple	100		84.2
5	Pink	100		84.3
6	Light Blue	100		84.3
7	Teal	10		84.2
8	Light Red	10		84.5
9	Green	10		84.2

Bin Name Temperature Sample No. Sample Name Peak

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Anexo-2. Quantitation Report-OCT-4

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico Oct-4
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.

Quantitation Information

Threshold	0.200
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.285 \cdot \text{CT} + 8.794)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.508 \cdot \log(\text{conc}) + 30.852$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 0.92777$
M	-3.50808
B	30.85175
R Value	0.99681
R^2 Value	0.99362
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

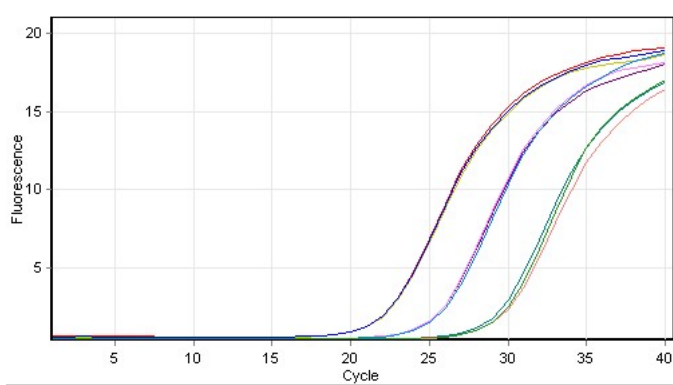
Messages

Message

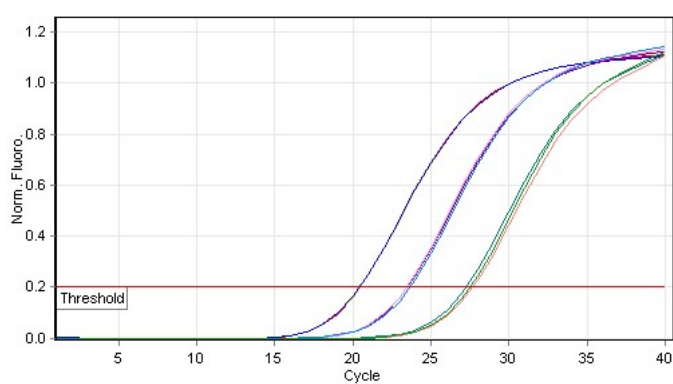
Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 40	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@56.7°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

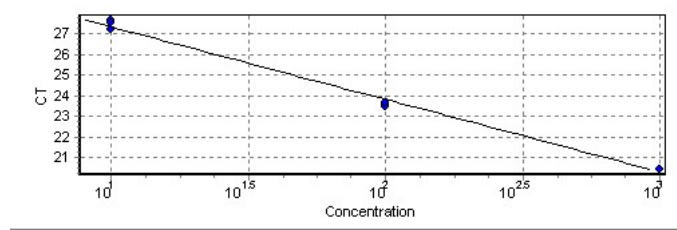
Raw Data For Cycling A.Green



Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	Red	1000	Standard	20.48		1000	905.592498603766
2	Yellow	1000	Standard	20.48		1000	904.311160488145
3	Blue	1000	Standard	20.45		1000	923.587749226037
4	Purple	100	Standard	23.52		100	123.33177369635
5	Pink	100	Standard	23.47		100	126.781366060748
6	Light Blue	100	Standard	23.67		100	111.792290425354
7	Teal	10	Standard	27.25		10	10.6019921855202
8	Light Red	10	Standard	27.68		10	8.04173460015706
9	Green	10	Standard	27.53		10	8.87138965262827

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Melt Report-OCT-4

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico Oct-4
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.

Melt Information

Digital Filter	Light
Imported Analysis Settings	
Sample Page	Page 1
Temp. Threshold	0°
Threshold	2.74261

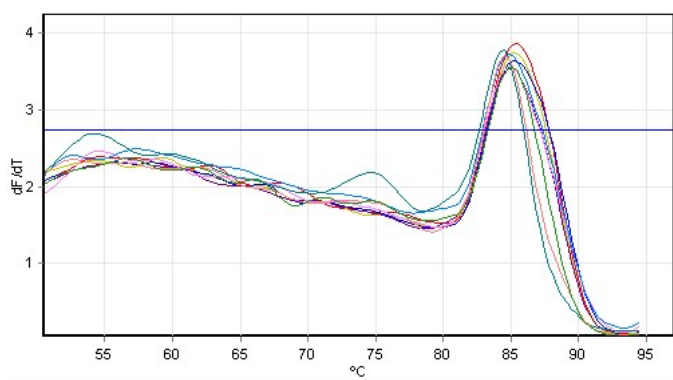
Messages

Message

Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 40	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@56.7°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

Melt data for Melt A.Green



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1
1	Red	1000		85.3
2	Yellow	1000		85.3
3	Blue	1000		85.3
4	Purple	100		85.0
5	Pink	100		85.0
6	Light Blue	100		84.8
7	Teal	10		84.5
8	Light Red	10		84.5
9	Green	10		85.0

Bin Name	Temperature	Sample No.	Sample Name	Peak
----------	-------------	------------	-------------	------

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Anexo 3. Quantitation Report-NANOG

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico NANOG
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.33

Quantitation Information

Threshold	0.3348
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0.308 \cdot \text{CT} + 9.610)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3.244 \cdot \log(\text{conc}) + 31.176$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 1.03352$
M	-3.24413
B	31.1757
R Value	0.9964
R^2 Value	0.99282
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

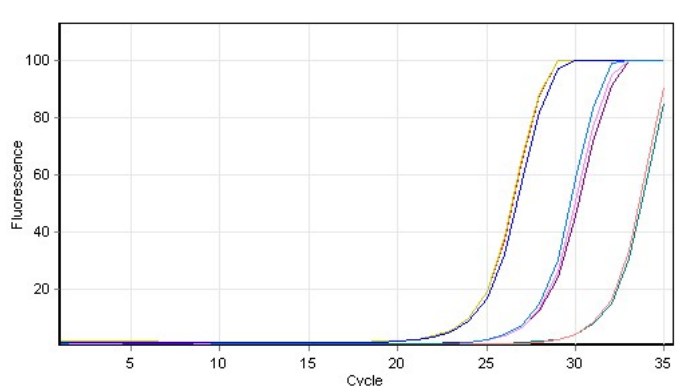
Messages

Message

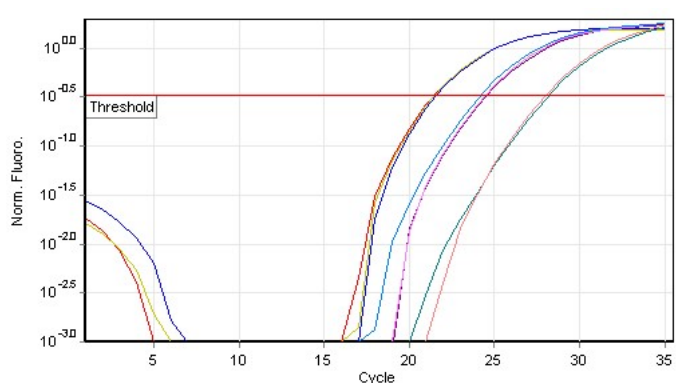
Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@54°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

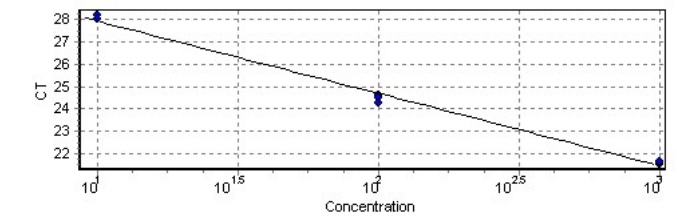
Raw Data For Cycling A.Green



Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	Red	1000	Standard	21.50		1000	958.971238762565
2	Yellow	1000	Standard	21.55		1000	929.805998750478
3	Blue	1000	Standard	21.64		1000	869.054748224366
4	Purple	100	Standard	24.59		100	106.882337025925
5	Pink	100	Standard	24.50		100	114.32762945953
6	Cyan	100	Standard	24.25		100	136.286467481411
7	Teal	10	Standard	28.21		10	8.21537991306441
8	Orange	10	Standard	28.01		10	9.43229577588898

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Melt Report-NANOG

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico NANOG
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.33

Melt Information

Digital Filter	Light
Imported Analysis Settings	
Sample Page	Page 1
Temp. Threshold	0°
Threshold	-0.04074

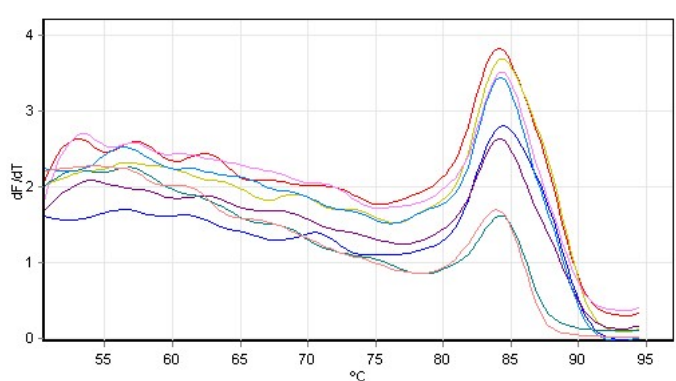
Messages

Message

Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@54°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

Melt data for Melt A.Green



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
1	■	1000		53.0	57.3	62.3	67.0	70.5	84.0
2	■	1000		56.5	69.0	73.0	84.3		
3	■	1000		56.5	60.8	70.5	84.5		
4	■	100		53.8	62.5	67.7	84.2		
5	■	100		53.5	57.2	60.5	84.3		
6	■	100		56.3	61.2	84.2			
7	■	10		53.2	56.8	84.2			
8	■	10		54.0	60.5	84.0			

Bin Name Temperature Sample No. Sample Name Peak

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Anexo 4. Quantitation Report-SOX-2

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico Sox2
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.

Quantitation Information

Threshold	0.0972
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0.313*CT + 9.580)}$
Standard Curve (2)	$CT = -3.200*\log(\text{conc}) + 30.654$
Reaction efficiency (*)	(* = $10^{(-1/m) - 1}$) 1.05366
M	-3.19971
B	30.65399
R Value	0.9903
R^2 Value	0.98068
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

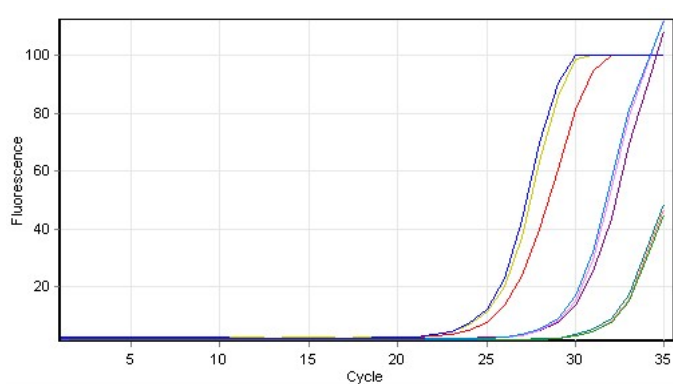
Messages

Message
Run was stopped after a hardware fault at user request

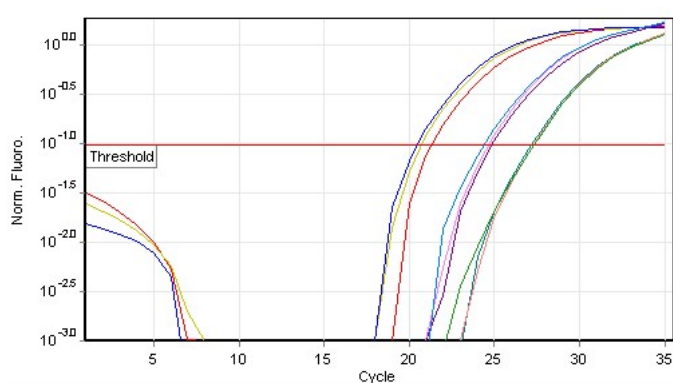
Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@60°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

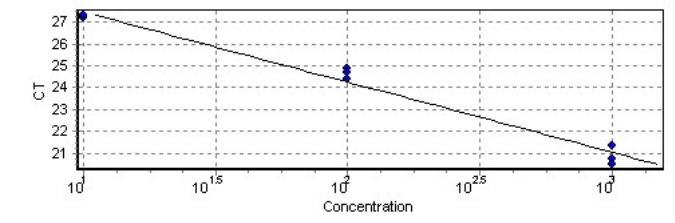
Raw Data For Cycling A.Green



Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	Red	1000	Standard	21.33		1000	819.65600380456
2	Yellow	1000	Standard	20.74		1000	1257.54682948145
3	Blue	1000	Standard	20.50		1000	1489.96435313934
4	Purple	100	Standard	24.89		100	63.4232919398598
5	Pink	100	Standard	24.67		100	74.1626238058951
6	Light Blue	100	Standard	24.40		100	90.1369368697795
7	Teal	10	Standard	27.16		10	12.3202643006238
8	Light Red	10	Standard	27.29		10	11.2769860885144
9	Green	10	Standard	27.32		10	11.053978100264

Warning: The following samples were not analysed :

10mastr primr agua- 11mastr primr agua- 12mastr primr agua- 13mastr agua- 14mastr agua- 15mastr agua- 16agua- 17agua- 18agua

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold. NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold. **Legend:**

Melt Report-SOX-2

Experiment Information

Run Name	Rango dinamico Sox2
Operator	Guadalupe
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	6.

Melt Information

Digital Filter	Light
Imported Analysis Settings	
Sample Page	Page 1
Temp. Threshold	0°
Threshold	0.

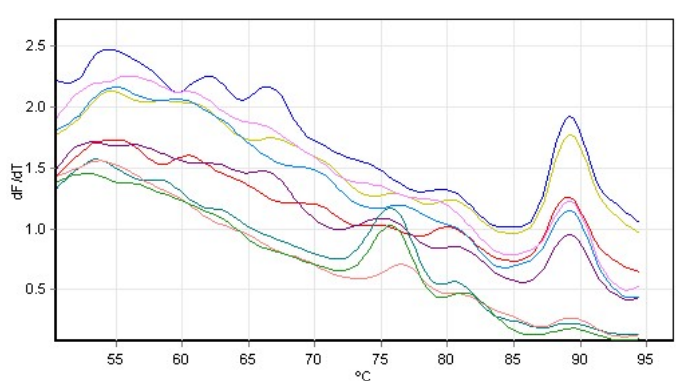
Messages

Message
Run was stopped after a hardware fault at user request

Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,100	
(repeats) Cycling 35	Step 1@95°, hold60secs
	Step 2@60°, hold60secs
	Step 3@72°, hold60secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
(-) Melt 5095°, holdsecs on the 1st step, hold5secs on next steps,Melt A([Green][1][1])	

Melt data for Melt A.Green



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
1	Red		1000	55.0	60.5	74.7	80.0	89.0		
2	Yellow		1000	54.7	58.5	66.7	76.0	80.3	89.3	
3	Blue		1000	54.3	62.0	66.5	79.5	89.2		
4	Purple		100	53.2	56.3	61.7	66.0	75.0	80.5	89.2
5	Pink		100	55.8	60.5	89.2				
6	Light Blue		100	55.0	59.7	76.3	89.2			
7	Teal		10	53.5	58.2	75.7	80.5	89.2		
8	Light Red		10	53.8	76.5	80.5	89.3			
9	Green		10	53.0	75.7	81.2	89.5			

Bin Name Temperature Sample No. Sample Name Peak

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
 Copyright ©2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
 ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Anexo 5

Fórmula para calcular la expresión relativa

$$\text{Veces de cambio relativo} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador} = \Delta\Delta Ct$$

$$\Delta Ct \text{ GOI}^S - \Delta Ct \text{ norm}^S = \Delta\Delta Ct \text{ muestra}$$

$$\Delta Ct \text{ GOI}^C - \Delta Ct \text{ norm}^C = \Delta\Delta Ct \text{ calibrador}$$

GOI = Gen de interés

Calibrador = Línea celular H9

Normalizador = Gen constitutivo GAPDH

Publicaciones derivadas de este trabajo



Pluripotency markers in tissue and cultivated cells *in vitro* of different regions of human amniotic epithelium

Guadalupe García-López^a, Daniela Ávila-González^a, Irma Lydia García-Castro^a, Héctor Flores-Herrera^b, Anayansi Molina-Hernández^a, Wendy Portillo^c, Néstor Emmanuel Díaz-Martínez^d, Alejandro Sanchez-Flores^e, Jerome Verleyen^e, Horacio Merchant-Larios^f, Néstor Fabián Díaz^{a,*}

^a Instituto Nacional de Perinatología, Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Nacional de Perinatología, Departamento de Inmuno-Bioquímica, Ciudad de México, Mexico

^c Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Querétaro, Mexico

^d Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Guadalajara, Jalisco, Mexico

^e Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Mexico

^f Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Pluripotency
Amnion
Epiblast

ABSTRACT

Studies have described the presence of pluripotent markers *in vivo* and *in vitro* in human amnion. However, the amnion can be divided into reflected, placental and umbilical regions that are anatomically and functionally heterogeneous. Here, we evaluated the expression of pluripotency markers in tissue and cultivated cells *in vitro* of different regions of human amnion. To this end, we determined the presence of the core pluripotency factors OCT-4, NANOG and SOX-2 by immunofluorescence and RT-PCR and also performed transcriptome analysis of the different regions of amnion tissue. We identified the mRNA and protein of the pluripotency factors in the different regions of human amnion tissue. However, the OCT-4 and NANOG immunolocalization was cytoplasmic, whereas SOX-2 immunolocalization was nuclear regardless of the region analyzed. Moreover, we found three subpopulations of cells in the *in vitro* cultures of reflected and placental amnion: cells with immunostaining only in the nucleus, only in the cytoplasm, or in both compartments. Yet no statistically significant differences were found between the reflected and placental amnion. These results suggest a homogeneous distribution of the pluripotency transcription factors of the different regions of human amnion to isolate stem cells that can be used in regenerative medicine.

1. Introduction

Human fetal membranes are extraembryonic tissue composed of amnion and chorion. The amnion is the innermost tissue and it is composed of five layers: the epithelium, the basement membrane, the compact layer, the fibroblast layer, and the spongy layer, whereas trophoblastic chorionic and mesenchymal tissue constitute the chorion, which is in contact with the amnion and maternal decidua tissues on

their inner and outer sides, respectively [1]. During embryo development human amniotic epithelial cells (hAEC) are thought to develop from the epiblast 8 days after fertilization and before gastrulation. In contrast, the chorion is derived from the trophoderm of the blastocyst [2]. Recently, a series of elegant experiments on a culture system of human embryo *in vitro* demonstrated that epiblast is the origin of two morphologically distinct groups of OCT4-expressing cells. One population was located near the hypoblast and had a columnar morphology,

Abbreviations: CD24, cluster of differentiation 24; cDNA, complementary DNA; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, Fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; hAEC, human Amniotic Epithelium Cells; hESC, human Embryonic Stem Cells; iPSC, induced Pluripotent Stem Cells; mRNA, RNA messenger; OCT-4, octamer-binding transcription factor 4; PBS, Phosphate buffered saline; BSA, Bovine serum albumin; RNA, Ribonucleic acid; RT-PCR, Reverse transcription-polymerase chain reaction; SOX-2, Sex determining Region Y-box 2; SSEA-3, Stage-specific embryonic antigen 3; SSEA-4, Stage-specific embryonic antigen 4; TRA-1-60, Tumor rejection antigen-1-60; TRA-1-81, Tumor rejection antigen-1-81

* Correspondence to: Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular, Montes Urales 800, CP. 11000 Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: nfdiaz00@yahoo.com.mx (N.F. Díaz).

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.12.007>

Received 13 September 2018; Received in revised form 21 November 2018; Accepted 11 December 2018

Available online 15 December 2018

0014-4827/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

whereas opposite-facing OCT4-positive cells had a distinct squamous and flat shape. These two types of OCT-4-expressing cells might represent the epiblast disc and the prospective amniotic epithelium, respectively [3]. Another group employing the same culture method demonstrated the formation of the amniotic cavity from an epiblast population (OCT/NANOG/CD24-positive) at day 10 post-fertilization [4]. All these data suggest that hAEC derive from a primordial population of pluripotent stem cells residing in the epiblast of the human embryo.

On the other hand, hAEC obtained from the tissue as well as cultured *in vitro* are positive for surface markers such as SSEA-3 (stage specific embryonic antigen-3), SSEA-4, TRA-1-60 (tumor rejection antigen), and TRA-1-81, and express mRNA and proteins of transcription factors including OCT-4, NANOG, and SOX-2 normally present in human pluripotent stem cells [5–11]. However, all these reports had treated the human amnion as a single, continuous structure and they did not discern between the anatomical regions of the amnion: placental amnion (amnion on the chorionic plate), reflected amnion (amnion of the free chorioamniotic membranes) and umbilical amnion (tissue that covers the surface of the umbilical cord) [12]. Interestingly, placental and reflected amnion are two biologically heterogeneous regions. Epithelial cells of reflected amnion are flat and symmetrical, whereas epithelial cells of placental amnion are cylindrical with decentralized nuclei [13]. Indeed, a microarray study showed differential expression of 839 genes associated with the presence of labor and the region of the amnion. The pathway analysis also demonstrated a contrast between signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinase and transforming growth factor beta, in placental and reflected amnion [14], whereas comparative microRNAome of the placental and reflected amnion showed a global down-regulation of differentially expressed miRNAs between both regions in the presence of labor at term [15]. Here, we evaluated pluripotency marker expression in tissue and cells cultivated *in vitro* of different regions of human amniotic epithelium.

2. Materials and methods

This study was approved by the ethical committee of the Instituto Nacional de Perinatología in Mexico City (Registry Number 212250-21041). All procedures performed in these studies were in accordance with the ethical standards of the Instituto Nacional de Perinatología, Helsinki declaration, and the guidelines set forth in the Ministry of Health's Official Mexican Standard. After receiving informed written consent, we obtained ten fetal membranes from women (24–42 years old) who underwent a cesarean section. We only included fetal membranes of uncomplicated full term (37–40 weeks gestation) pregnancies; that is, pregnancies without activation of labor, premature rupture of membranes, or evidence of microbiological signs of chorioamnionitis or lower genital tract infections.

2.1. Obtaining human amnion tissue

Human fetal membranes were transported from the operating theater to the Physiology and Developmental Biology laboratory in a sterile container with saline solution. In sterile conditions, we identified and separated the different regions of the amnion (reflected, placental, and umbilical amnion) (Fig. 1). After dissection, the amnion was mechanically peeled off of the chorion and washed several times with saline solution to remove blood and clots. Tissue samples of each region were processed according to the specific techniques described below.

2.2. Isolation and culture of human amniotic epithelial cells

To obtain the hAEC, we followed the protocol previously reported [6,16]. Briefly, the different regions of the amnion were incubated in 0.05% trypsin-EDTA (Life Technologies, Thermo Scientific, MA, USA)

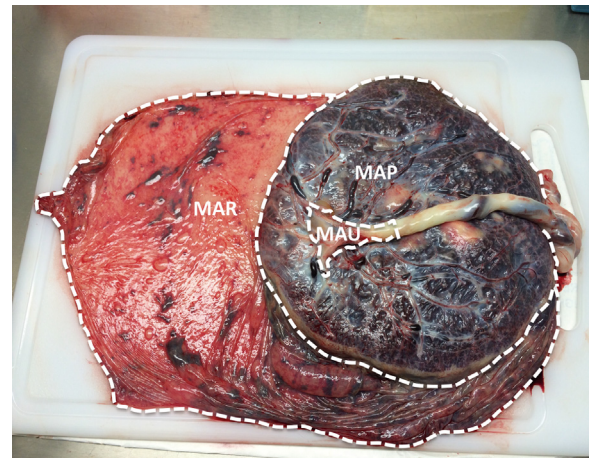


Fig. 1. Anatomic regions from amniotic membrane in the fetal annexes at term used in this study. MAU, umbilical amnion; MAP, placental amnion and MAR, reflected amnion.

for two periods of 40 min each at 37 °C. The trypsin digestion was centrifuged at 200 × g at 4 °C for 10 min and the pellet was suspended in 10 ml of standard culture medium. Later, the cell suspension was physically disaggregated and filtered through a 100 μm cell strainer in order to obtain a single cell suspension. hAEC were cultivated on 100-mm culture plates at 3 × 10⁴ cells/cm² in cultured media (DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% antibiotic-antimycotic, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids and 55 μM β-mercaptoethanol; all from Life Technologies) supplemented with 10 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF; Peprotech, NJ, USA). The dishes were incubated at 37 °C in normoxia conditions (5% CO₂, 95% air) in a humidified incubator. The medium was changed every 3 days and supplemented with 10 ng/ml EGF every day. Finally, two cell passages were performed (P0, P1 and P2) using 0.25% trypsin/EDTA (Life Technologies).

2.3. Culture of human embryonic stem cells

As a control of human pluripotent cells, we used human Embryonic Stem Cell (hESC) line H9 (WB0143), obtained from WiCell Research Institute, Inc. The cell line was cultured and maintained as previously reported [17,18].

2.4. RNA-seq

2.4.1. Preparation of cDNA library and RNA-seq

Libraries were generated from isolated total RNA using the Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit according to the manufacturer's instructions. Transcriptome sequencing was conducted using the Genome Analyzer GAIIx (Illumina) at the Instituto de Biotecnología UNAM genome sequencing facility. A configuration for paired-end reads with a 75 bp read length was used.

2.5. Bioinformatics analysis

Quality Control (QC) of raw reads was performed using FASTQC software³³ and contamination and adapter removal was carried out using in-house Perl scripts. Filtered reads were mapped to the human reference genome GRCh38.p9 using SMALT v0.7.6. The index and mapping were performed using default options. After mapping, duplicated reads were marked using Picard Tools v2.18.2 in resulting BAM files. From the marked-duplicate BAMs total effective counts for each sample were calculated using coverageBed from BEDtools and all samples were merged using an in-house Perl script. The differential expression analysis was performed using the IDEAMEX webserver

(<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>) which runs DEseq, DEseq. 2, EdgeR, and NOISeq programs. The result intersection from all 4 methods was used for all subsequent analyses. Differentially expressed genes were separated into up- and down-regulated genes for each condition and GO and KEGG term enrichment analyses were performed using the WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://www.webgestalt.org/>) using default options.

2.6. Immunofluorescence assay

Immunofluorescence assays for tissue and *in vitro* hAEC were performed following established protocols [6,17]. Briefly, tissue was fixed for 15 min at -20 °C with methanol and then washed with PBS 1 × . Later, tissue was embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek USA, CA, USA) and frozen at -80 °C. Slices of 10 μm were obtained using a cryostat (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Germany). Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS. To block unspecific epitopes, we incubated the cells with 5% bovine serum albumin (BSA, AMRESCO, Solon, OH, USA). The epithelial identity was evaluated in hAEC using mouse anti-E-Cadherin (1:100, Cat 610181, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). To evaluate pluripotency, the following primary antibodies were used: rabbit anti-OCT-4 (1:100, Cat. Ab19857, Abcam, San Francisco, CA, USA), rabbit anti-SOX-2 (1:200, Cat. Ab5603, Merck Millipore, USA) and rabbit anti-NANOG (1:500, Cat. 500-P236, Peprotech, Rockhill, NJ, USA). Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and incubated with appropriate fluorescently labeled secondary antibodies for 2 h at room temperature. Finally, we counterstained the cell nuclei with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Our negative controls consisted of cultures in which the primary antibody was omitted. These experiments did not produce any staining (data not shown). H9 cells were used as pluripotency controls.

2.7. Cell counting

At the end of each passage (P0-P2), we took photomicrographs of the immunofluorescence with an epifluorescence microscope (Olympus IX-81, Tokyo, Japan) and a CCD camera (Hamamatsu, ORCA-Flash 2.8, Tokyo, Japan). The number of positive cells were evaluated in nine random fields at 200X from five independent experiments. To establish co-expression of markers with E-Cadherin, merged images were generated using Photoshop software. We quantified the total number of cells by counting the DAPI-stained nuclei and the percentage of positive cells for each experiment according to the following equation: % of positive cells = (number of positive cells to a specific marker X 100) / total number of cell nuclei (DAPI positive).

2.8. Confocal microscopy

In amnion tissue, pluripotency factor-positive cells images were acquired using an LSM 510 META confocal microscope (ZEISS, Germany) with a plan-neofluar objective (NA 0.75) to detect Hoechst and Alexa Fluor 488 and 568 in a sequential fashion by exciting with different lasers.

2.9. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was carried out following our previously reported protocols [6,17]. Briefly, we isolated the total RNA from the tissue and cultivated cells of the different regions of human amnion using TRIzol (Life Technologies). We transcribed using a Reverse Transcription System (Promega A3500, Madison, WI, USA) and amplified using a PCR kit (Promega GoTaq® Flexi DNA Polymerase M8295, Madison, WI, USA), with the following forward (F) and reverse (R) primers (Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, IA, USA). The primer sequences,

temperature of annealing, and expected size of the products were: **OCT4-F** 5'-GAGGAGTCCCAGGACATCAA-3', **OCT4-R** 5'-GTCGTTTGGC TGAATACCTT-3', TM = 56.7 °C, 149pb; **NANOG-F** 5'-TGCAAATGTCT TCTGCTGAGT-3', **NANOG-R** 5'-GTTCCAGGATGTTGGAGAGTTC-3', TM = 53.9 °C, 286pb; **SOX-2-F** 5'-GCCGAGTGGAAACTTTTGTTC-3', **SOX-2-R** 5'-GTTTCATGTGCGCGTAACTGT-3', TM = 55.3, 264pb; **GAPDH-F** 5'-AAGGTGAAGGTCCGAGTCAAC-3', **GAPDH-R** 5'-CCTGGA AGATGGTGATGGGAT-3', TM = 56.7 °C, 229pb.

Cycling parameters were as follows: denaturalization at 95 °C for 1 min, annealing at specific temperatures for 1 min and elongation at 72 °C for 1 min. The number of cycles was 35 for all genes. Final extension lasted 10 min at 72 °C and was terminated by rapid cooling to 4 °C. We analyzed PCR products in a 2% agarose gel and determined their sizes by comparison with molecular weight standards after GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) staining. Images were captured with a gel documentation system (DNR Bio-Imaging System, Jerusalem, Israel) using Gel Capture Acquisition software (DNR Bio-Imaging System). We included reactions without cDNA as negative control for PCR amplification. After normalizing the expression of each transcript by the corresponding optic density of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) bands, the relative expression was expressed as mean ± error standard of the mean (S.E.M) from 10 fetal membranes.

2.10. Real-time PCR

qRT-PCR was carried out following our previously reported protocol [6]. Briefly, total RNA was extracted from the tissue of the different regions of human amnion and then reverse-transcribed to cDNA using a Reverse Transcription System (Promega A3500). qPCR was performed with the same parameters as for end-point PCR, but using KAPA SYBER FAST qPCR (KAPA Biosystem, Wilmington, MA, USA) carried out in a Rotor-Gene Q thermocycler (Quiagen, Valencia, CA, USA). Dynamic ranges were measured for each gene before the qPCR analysis to determine the fluorescence threshold and reaction efficiency. The relative fold changes were determined using the mathematical algorithm $2^{-\Delta\Delta CT}$. Relative target genes levels were normalized to the GAPDH mRNA level.

2.11. Sequencing

The PCR products corresponding to pluripotency genes were visualized in 2% agarose gel by electrophoresis. The bands were isolated and purified using the Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, CA, USA) and the cDNA was sent to the *Unidad de Proteogenómica* at the *Instituto de Neurobiología-UNAM* for cloning and sequencing with a BigDye termination sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using a thermocycler and ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Cloned sequences were compared with the corresponding GenBank accession numbers.

2.12. Statistical analysis

Data from the expression of transcription factors was normally distributed and therefore analyzed by analysis of variance (ANOVA). Data from the percentage of transcription factors in cell cultures were analyzed by performing a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks. In case of significant differences, we used a Tukey post hoc test. Statistical analyses were performed using Sigma-Plot 12 software.

3. Results

As a first approach, we performed transcriptome analysis in order to identify pluripotency genes differentially expressed in different regions of human amnion tissue. We found differential expression of 296, 88 and 4 genes for placental vs reflected, reflected vs umbilical, and placental vs umbilical, respectively. Analysis of transcripts showed that the

Table 1

Gene ontology (GO) analysis and KEGG terms of down regulate genes in placental vs reflected region of amnion tissue.

Gene ontology term	P-value	Genes
Biological process	9.04E-09	COL5A2, COL11A1, COMP, EGFLAM, FBLN1, ITGA11, PHLDB1, FMOD, EGFL6, TNC, ITGA4, LAMA4, LOXL1, MMP2, COL5A3, VCAM1, ANTXR1, CREB3L1, CD44
GO:0043062 extracellular structure organization		
Biological process	2.56E-06	COL5A2, COL11A1, COL15A1, F2R, ID1, MMP2, COL5A3, TGFB3, CREB3L1, MRC2
GO:0044236 multicellular organism metabolic process		
Biological process	1.16E-05	EGFLAM, FBLN1, ITGA11, EGFL6, ID1, ITGA4, BCAM, COL5A3, THY1, VCAM1, VEGFC, ANTXR1, AJUBA, CD44
GO:0031589 cell-substrate adhesion		
Biological process	2.26E-05	CTHRC1, COL5A2, COL11A1, JAG1, FGFR2, ITGA11, TNC, TMEM119, ID1, IGFBP5, LRP4, MMP2, TGFB3, CREB3L1, MRC2
GO:0001503 ossification		
Biological process	5.62E-05	ADA, MYL9, HSPB6, CNN1, F2R, GPD1L, LMOD1, GDNF, ANXA6, IGFBP5, ACTA2, TPM2, SPHK1, MYOCD, AKAP6
GO:0003012 muscle system process		
Biological process	5.82E-05	RAMP1, CHI3L1, COL15A1, JAG1, FGFR2, DDAH1, ID1, AQP1, MMP2, PRRX1, THBS2, THY1, VEGFC, SCG2, TEAD2, SPHK1, MYOCD
GO:0048514 blood vessel morphogenesis		
Biological process	1.23E-04	PTTG2, CDCA5, SPC24, SGO1, ECT2, NUSAP1, PLK1, CDCA8, TOP2A, PSRC1, PRC1, PTTG1, CDC6
GO:0007059 chromosome segregation		
Biological process	1.64E-04	CDCA5, SPC24, SGO1, TPX2, NUSAP1, PLK1, CDCA8, PBK, PSRC1, CCNA2, PRC1, PKMYT1, PTTG1, CDK1, CDC6
GO:0007067 mitotic nuclear division		
Biological process	3.8E-04	PLK1, PSRC1, CCNA2, PKMYT1, MYOCD, CDC6
GO:1904029 regulation of cyclin-dependent protein kinase activity		
Biological process	4.92E-04	CHI3L1, COL5A2, COL11A1, COMP, FGFR2, HOXC4, HOXC6, TMEM119, MMP2, PRRX1, PDGFC, TBX3, TGFB3, WNT5B, CD44
GO:0001501 skeletal system development		
Cellular Component	4.13E-10	CHI3L1, CTHRC1, COL5A2, COL11A1, COL15A1, COMP, EGFLAM, CILP2, FBLN1, GPC4, FMOD, EGFL6, TNC, LAMA4, LOXL1, MMP2, COL5A3, THBS2, TFPI2, WNT5B, WISP1, PAPLN
GO:0005578 proteinaceous extracellular matrix		
Cellular Component	3.01E-07	COL5A2, COL11A1, COL15A1, EGFLAM, FBLN1, EGFL6, TNC, LAMA4, LOXL1, COL5A3, THBS2
GO:0044420 extracellular matrix component		
Molecular Function	3.4E-07	CHI3L1, COL5A2, COL11A1, COL15A1, COMP, FBLN1, LAMA4, COL5A3, TFPI2
GO:0005201 extracellular matrix structural constituent		
Molecular Function	5.59E-06	COMP, EGFLAM, FGFR2, FMOD, MDK, COL5A3, PCOLCE, CXCL6, SOD3, THBS2, WISP1, CD44
GO:0005539 glycosaminoglycan binding		
Molecular Function	5.96E-06	FST, COMP, GPC4, FGFR2, FMOD, GSTM3, MDK, COL5A3, PCOLCE, CXCL6, SOD3, THBS2, WISP1
GO:1901681 sulfur compound binding		
Molecular Function	1.13E-05	COMP, ITGA11, COL5A3, PCOLCE, ANTXR1, CD44, MRC2
GO:0005518 collagen binding		
Molecular Function	2.11E-04	FBLN1, SSC5D, IGFBP5, ITGA4
GO:00 01968 fibronectin binding		
Molecular Function	2.29E-04	FST, COMP, GPC4, TNC, LDLR, COL5A3, TFRC
GO:0001948 glycoprotein binding		
Molecular Function	8.72E-04	CNN1, CNN2, CNN3, COTL1, DAAM2, LMOD1, ENAH, MARCKSL1, TAGLN, TPM2, ANTXR1, AJUBA, HOMER2
GO:0003779 actin binding		
Molecular Function	1.09E-03	RAMP1, GPC4, ITGA4, NECTIN1
GO:0015026 coreceptor activity		
KEGG hsa04512 ECM-receptor interaction	2.39E-02	COMP, ITGA11, TNC, ITGA4, LAMA4, THBS2, CD44
KEGG hsa04110 Cell cycle	2.54E-02	PTTG2, PLK1, TGFB3, CCNA2, PKMYT1, PTTG1, CDK1, CDC6
KEGG hsa04510 Focal adhesion	2.54E-02	MYL9, COMP, ITGA11, TNC, ITGA4, LAMA4, PDGFC, THBS2, VEGFC, PIK3R3
KEGG hsa04151 PI3K-Akt signaling pathway	2.82E-02	COMP, F2R, FGFR2, ITGA11, GNG11, TNC, ITGA4, LAMA4, PDGFC, THBS2, VEGFC, PIK3R3, CREB3L1

expression levels of 21 genes were higher and 275 genes were lower in placental than reflected tissue. When we compared reflected vs umbilical regions, we found 80 transcripts up- and 8 transcripts down-regulated in reflected tissue. Finally, 4 transcripts were down-regulated in placental compared to umbilical regions. However, we did not find any difference for pluripotency genes.

The expression data were organized into Gene Ontology Consortium groups. When we compared placental vs reflected regions, we only found decreased expression in the main categories for extracellular structure organization, multicellular organism metabolic process, cell-substrate adhesion, ossification, muscle system process, blood vessel morphogenesis, chromosome segregation, mitotic nuclear division, regulation of cyclin-dependent protein kinase activity, and skeletal system development (Table 1). In contrast, when we compared the reflected vs umbilical tissue we found increased expression in the main categories for extracellular structure organization, cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus, blood vessel morphogenesis, ERK1 and ERK2 cascade, respiratory tube development, skeletal system development, respiratory system development, muscle system development, connective tissue development, and fibroblast proliferation (Table 2).

In order to analyze pathways, all differentially expressed genes were classified based on information regarding gene function using Gene

Ontology from the KEGG pathway database. This analysis demonstrated hsa04512:ECM-receptor interaction, hsa04110:Cell cycle, hsa04510:Focal adhesion and hsa04151:PI3K-Akt signaling were down-regulated with a FDR cutoff of < 0.05 for placental vs reflected amnion, whereas hsa04151: PI3K-Akt signaling and hsa04510:Focal adhesion were up-regulated in reflected vs umbilical tissues. These results suggest no changes in the expression levels in the pluripotency associated transcription factors of the different regions of human amnion tissues.

To corroborate the RNAseq results, we determined the mRNA expression of the core pluripotency factors in the different regions of human amnion tissue through RT-PCR. We found expression of *OCT-4*, *SOX-2* and *NANOG* in all regions of human amnion tissue (Fig. 2A, B and C). We also confirmed that the PCR products (149, 264 and 286 bp) were consistent with the sequences reported for *OCT-4/POU5F1* (accession number [NM_002701](#)), *SOX-2* (accession number [NM_003106](#)), *NANOG* (accession number [NM_024865](#)) and *GAPDH* (accession number [NM_002046](#)) (data not shown). However, no statistically significant differences were found in the relative value expression for each gene among the regions analyzed (Fig. 2A, B and C). In these experiments, we used the line H9 as a control. These data also were quantified validated through qRT-PCR, where the different regions of the amnion have a minor expression level of the pluripotency factors in comparison

Table 2
Gene ontology (GO) analysis and KEGG terms of up regulate genes in reflected vs umbilical region of amnion tissue.

Gene ontology term	P-value	Genes
Biological process GO:0043062 extracellular structure organization	3.65E-10	COMP, CTSK, FBLN1, FMOD, EGFL6, TNC, KDR, MFAP4, MMP2, PDGFRA, COL14A1, VTN, ANTXR1
Biological process GO:0035924 cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	1.49E-05	GAS1, NR4A1, KDR, PDGFRA
Biological process GO:0048514 blood vessel morphogenesis	2.01E-05	RAMP1, CHI3L1, NR4A1, AQP1, KDR, MMP2, PDGFRA, PRRX1, CYSLTR2, SPHK1
Biological process GO:0070371 ERK1 and ERK2 cascade	6.48E-05	CHI3L1, F2R, FBLN1, IGF1, KDR, PDGFRA, CYSLTR2
Biological process GO:0030323 respiratory tube development	6.7E-05	CHI3L1, TNC, IGFBP5, PDGFRA, WNT2B, PKDCC
Biological process GO:0001501 skeletal system development	1.05E-04	CHI3L1, COMP, FREM1, IGF1, MMP2, PDGFRA, PRRX1, WNT2B, PKDCC
Biological process GO:0060541 respiratory system development	1.28E-04	CHI3L1, TNC, IGFBP5, PDGFRA, WNT2B, PKDCC
Biological process GO:0003012 muscle system process	1.51E-04	MYL9, HSPB6, F2R, IGF1, IGFBP5, ACTA2, TPM2, SPHK1
Biological process GO:0061448 connective tissue development	3.32E-04	CHI3L1, COMP, PRRX1, ACTA2, WNT2B, PKDCC
Biological process GO:0048144 fibroblast proliferation	3.55E-04	IGF1, AQP1, PDGFRA, SPHK1
Cellular Component GO:0005578 proteinaceous extracellular matrix	2.09E-11	CHI3L1, COMP, FREM1, FBLN1, GPC4, FMOD, EGFL6, TNC, MFAP4, MMP2, COL14A1, VTN, WNT2B, TFP12
Cellular Component GO:0044420 extracellular matrix component	3.25E-07	FREM1, FBLN1, EGFL6, TNC, MFAP4, COL14A1, VTN
Cellular Component GO:0043292 contractile fiber	1.31E-03	MYL9, PDLIM3, MMP2, ACTA2, TPM2
Molecular Function GO:0005518 collagen binding	6.45E-06	COMP, CTSK, COL14A1, VTN, ANTXR1
Molecular Function GO:0005201 extracellular matrix structural constituent	1.6E-05	CHI3L1, COMP, FBLN1, COL14A1, TFP12
Molecular Function GO:0001948 glycoprotein binding	6.25E-05	COMP, CTSK, GPC4, TNC, LDLR
Molecular Function GO:0001968 fibronectin binding	1.46E-04	CTSK, FBLN1, IGFBP5
Molecular Function GO:0008307 structural constituent of muscle	6.95E-04	MYL9, PDLIM3, TPM2
KEGG hsa04151 PI3K-Akt signaling pathway	1.99E-03	COMP, F2R, GNG11, NR4A1, TNC, IGF1, KDR, PDGFRA, VTN
KEGG hsa04510 Focal adhesion	2.32E-03	MYL9, COMP, TNC, IGF1, KDR, PDGFRA, VTN

as H9, however, we found no statistically significant differences among the three regions of human amnion tissue for any of the three genes measured (Supplementary fig. 1).

Subsequently, we determined the presence of the pluripotency transcription factors in the reflected, placental, and umbilical regions of human amnion tissue using confocal microscopy. We found OCT-4, NANOG, and SOX-2-positive cells colocalized with E-Cadherin in all regions evaluated, demonstrating their epithelial nature. Nonetheless, the labeling for OCT-4 and NANOG was cytoplasmic, while SOX-2 was localized within the nucleus (Fig. 3).

As a third approach, we determined the expression of *OCT-4*, *SOX-2*, and *NANOG* in cell cultures derived from reflected and placenta regions. No statistical significant differences were found in mRNA expression of *OCT-4* (Fig. 4A), *NANOG* (Fig. 4B), or *SOX-2* (Fig. 4C) at different *in vitro* passages (P0-P2) in both regions. The umbilical region not was included in the analysis because a low number of cells were obtained.

Due to our results in the amnion tissue, where the immunostaining for the transcription factors OCT-4 and NANOG were not localized in the nucleus as expected, we determined the localization of the pluripotent transcription factors in cell cultures through P0-P2. They were localized in the nucleus, in the cytoplasm or in both compartments (Figs. 5–7). However, no statistically significant differences were found in the percentage of positive cells for each transcription factor between placental and reflected regions in any passage (Fig. 8).

Interestingly, we only found significant differences in the percentage of NANOG-positive cells in the placental region at passages 0 (H=6, 2 gl, P = 0.025) 1 (H=7, 2 gl, P = 0.013) and 2 (H=7, 2 gl,

P = 0.013). The post hoc test demonstrates that there is a significant difference between nuclear and cytoplasmic regions in all passages, whereas in the reflected region there is a significant difference in passages 0 (H = 7, 2gl, P = 0.030) 1 (H = 7, 2 gl, P = 0.019) and 2 (H = 8, 2 gl, P = 0005). The post hoc test also reveals significant differences between nuclear and cytoplasmic markers in all passages (Fig. 8 B and B').

4. Discussion

hAEC could be a valuable resource for both basic science and regenerative medicine because they possess properties such as ease of accessibility, reduced ethical concerns, presence of markers involved in pluripotency, etc. Also, as a consequence of their embryonic origin hAEC could serve as a human model to examine normal and pathological *in vitro* differentiation processes, in the same way as hESC and iPSC. hAEC have not been as extensively studied as other human stem cells. In the present study, we demonstrated the presence of the mRNA and protein of the core pluripotency factors in the different regions of human amnion tissue. However, the OCT-4 and NANOG immunolocalization was cytoplasmic, whereas SOX-2 immunolocalization was nuclear regardless of the region analyzed. On the other hand, we found three subpopulations of cells in the *in vitro* cultures of reflected and placental amnion: cells with immunostaining for core of pluripotency only in nucleus, only in the cytoplasm, or in both compartments. Nevertheless, no statistically significant differences were found between the reflected and placental amnion. These data were corroborated with our differential expression analysis among the different

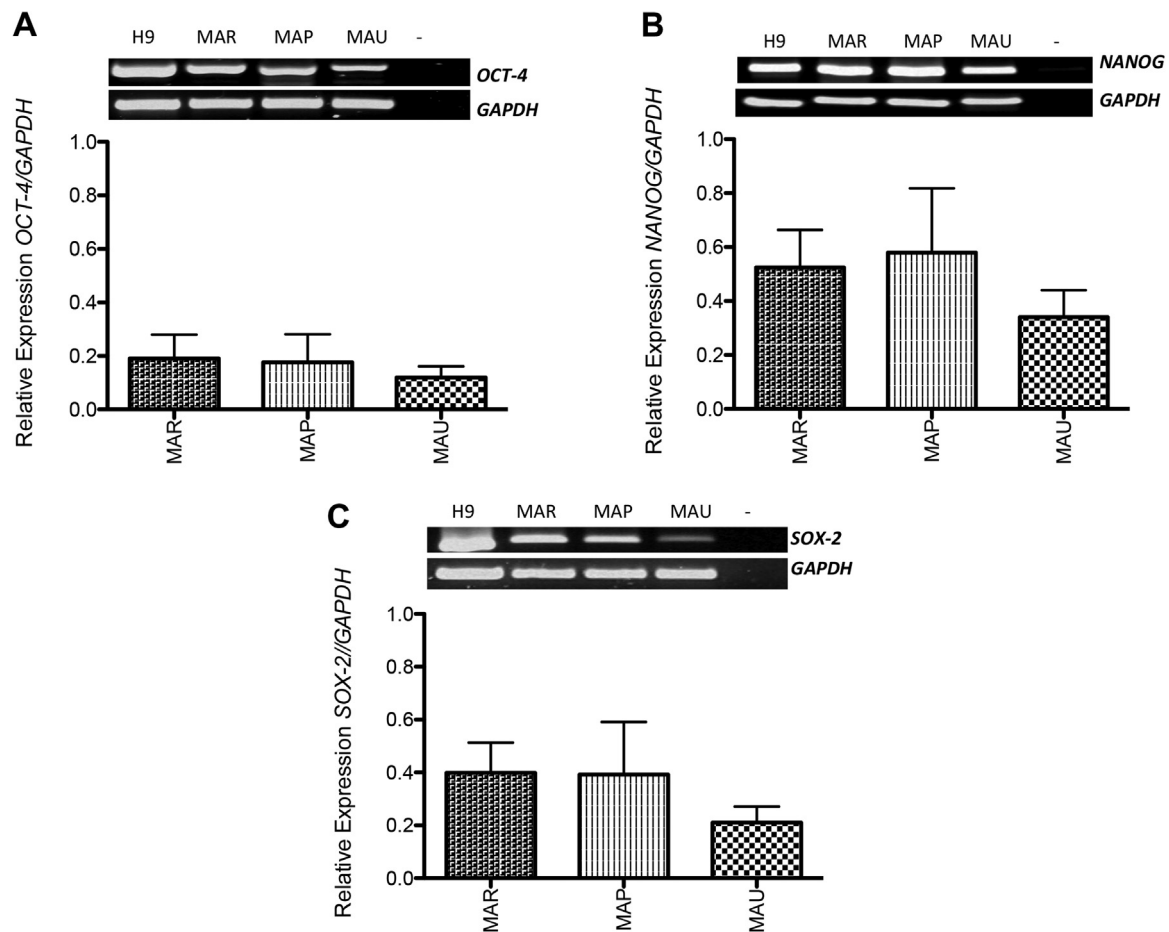


Fig. 2. Expression of the core pluripotency genes *OCT-4*, *NANOG* and *SOX-2* in different anatomic regions of the amniotic membrane. Representative images of RT-PCR endpoint products in gel electrophoresis with their respective semiquantitative analysis for each individual transcription factor (A, *OCT-4*; B, *NANOG*; C, *SOX-2*). H9, human embryonic stem cells line as positive control; MAR, reflected amnion; MAP, placental amnion and MAU, umbilical amnion. *GAPDH* was used as loading control and for normalization. (n = 10).

regions of the amnion tissue demonstrating no differences in genes involved in the human pluripotency network.

Our RNA-seq data suggested that human amnion tissue from normal term pregnancies are not a homogenous population. Several studies have demonstrated the heterogeneity of the human amnion [19–21]. A previous report used microarray analysis to establish that 839 unique genes, 56 enriched biological processes, and 19 signaling pathways were associated with regional differences between placental and reflected amnion [14]. Our study found differences in a minor number of genes, biological processes, and signaling pathways between both tissues. These discrepancies could be explained by different platforms to acquire the data (microarray vs RNA-seq) as well as the statistical method used to obtain the differential expression analysis. Regardless, signaling pathways differentially expressed within placental and reflected regions such as Cell adhesion molecules, ECM-receptor interaction, and Focal adhesion overlapped in both studies.

On the other hand, the distribution of cell populations that express the triad of pluripotency transcription factors in the different regions of human amnion has not been explored. Our results demonstrated that the expression of mRNA and protein belonging to *OCT-4*, *SOX-2*, and *NANOG* were similar among the regions analyzed in the tissue. These data suggest that stem cells in the amnion do not require a specialized niche microenvironment as described for other adult stem cell populations, where cells reside in anatomically specialized regions [22]. This finding can be explained because the amnion lacks two niche components: blood vessels that carry nutritional support and systemic signals and neural inputs that favour the mobilization of stem cells from their

niches [23].

Interestingly, we found differences in PI3k-Akt, focal adhesion, and ECM-receptor interaction pathways among different regions of the human amnion tissue. The first PI3k-Akt pathway contributes to a variety of processes that are critical in mediating many aspects of cellular functions including nutrition uptake, anabolic reactions, cell growth, and survival. This signaling pathway is also crucial for embryonic development and is indispensable for the self-renewal of pluripotent stem cells [24]. Indeed, PI3K inhibition in hESC results in the downregulation of pluripotency markers concomitant with the regulation of lineage-specific genes [25]. On the other hand, we have detected differential expression of genes involved in cell/focal adhesion such as integrins that control a host of cellular functions through inside-out and outside-in signaling including cell motility, differentiation, proliferation, and embryonic development [26], consistent with the histological properties of hAEC and their role as barrier protecting the foetus from external mechanical forces. Consistent with our results, these pathways have been reported as enriched in the amnion compared with other structures of the placenta [27], as well as in the secretome of hAEC [28]. However, the biological significance of the differential expression of the individual genes among the amnion regions remains unknown. In future studies, it would be useful to apply single cell RNA-sequencing of hAEC obtained from the different regions.

It has been reported that *OCT-4* is a master regulator of proliferation and self-renewal of ESC. Given its importance, *OCT-4* expression is tightly controlled and any disruptions are expected to have adverse effects on cell proliferation and differentiation. Since *OCT-4* protein can

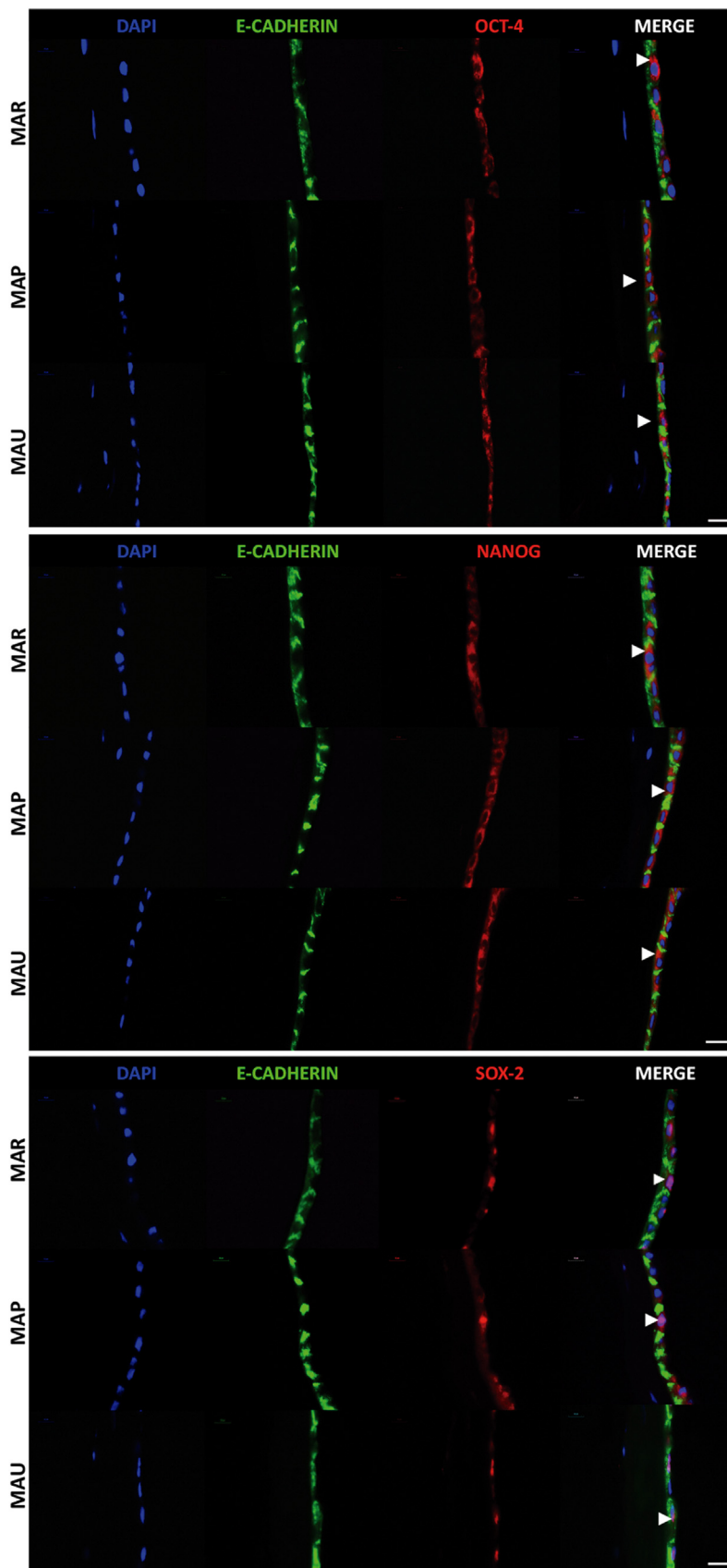


Fig. 3. Amniotic membrane is positive for OCT-4, NANOG and SOX-2. Representative confocal micrographs of immunostaining for E-Cadherin (green) co-expressing with OCT-4 (upper panel), NANOG (middle panel) and SOX-2 (bottom panel) (red) in different anatomic regions of the amniotic membrane. Nuclei were detected with DAPI staining (blue) and arrows indicate cytoplasmic distribution for OCT-4 and NANOG or nuclear labeling for SOX-2. MAR, reflected amnion; MAP, placental amnion and MAU, umbilical amnion.

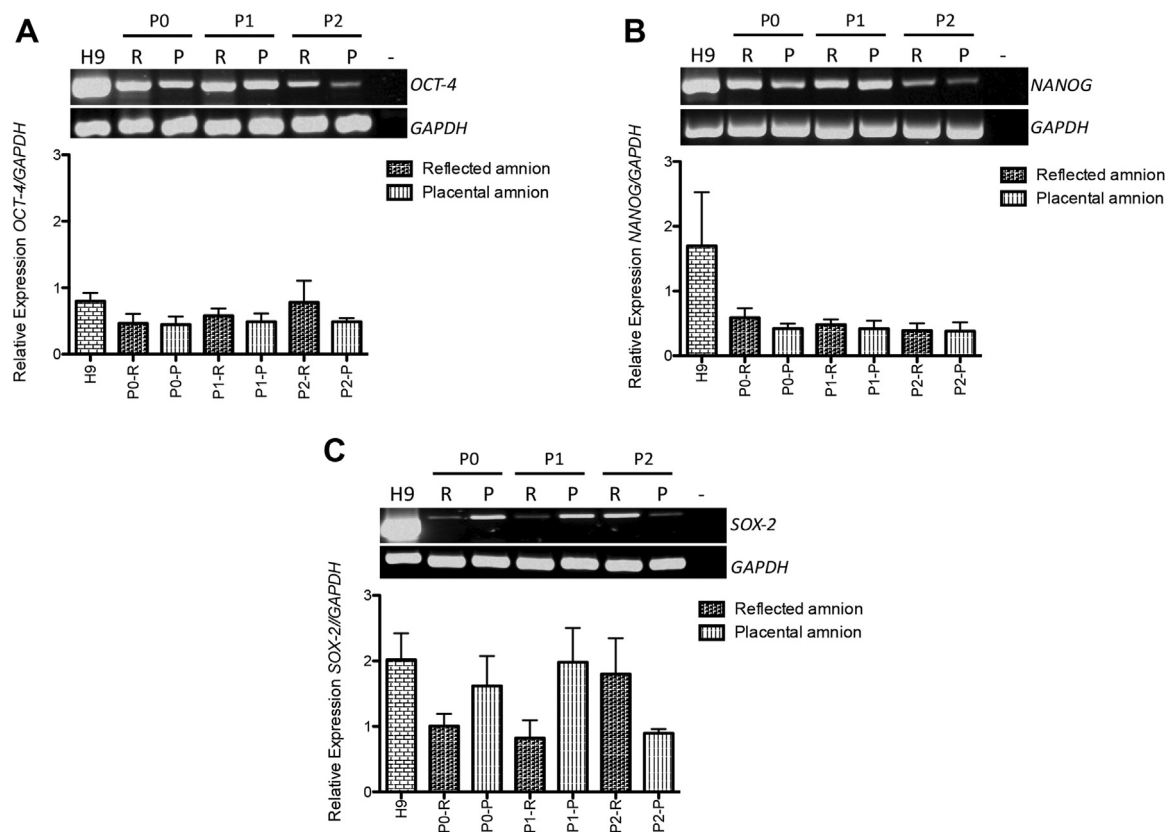


Fig. 4. Expression of *OCT-4*, *NANOG* and *SOX-2* in hAEC cultured *in vitro* isolated from different anatomic regions of amniotic membrane. Representative image of RT-PCR endpoint of *OCT-4* (A), *NANOG* (B) and *SOX-2* (C) in hAEC cultured from P0 to P2. H9, human embryonic stem cells line as positive control; R, reflected amnion; P, placental amnion; *GAPDH*, loading control. Relative expression of endpoint RT-PCR of *OCT-4* (A), *NANOG* (B) and *SOX-2* (C) normalized with *GAPDH*. (n = 5).

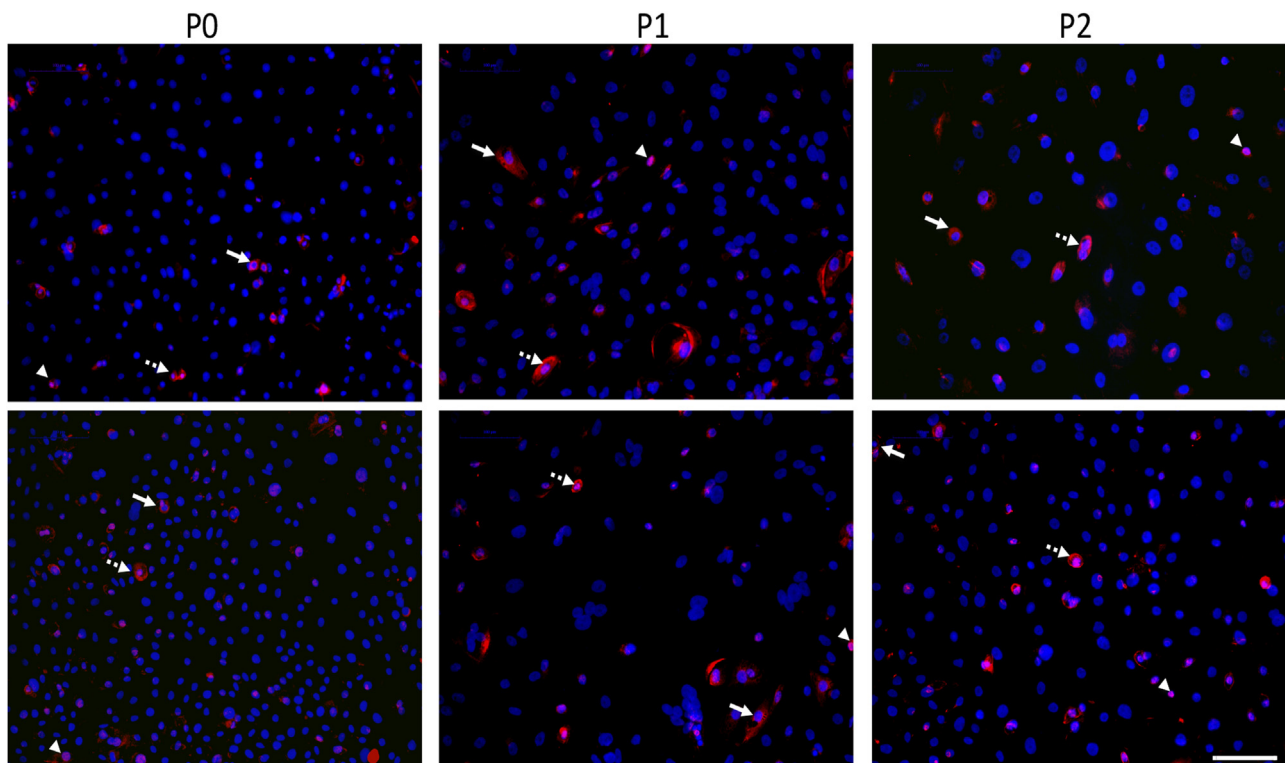


Fig. 5. hAEC *in vitro* are positive for *OCT-4*. Representative micrographs of hAEC from reflected (upper panel) and placental amnion (lower panel), immunostained for *OCT-4* (red) and cultured at P0-P2. The localization of *OCT-4* can be nuclear (arrowhead), cytoplasmic (arrow) or both (dashed arrow).

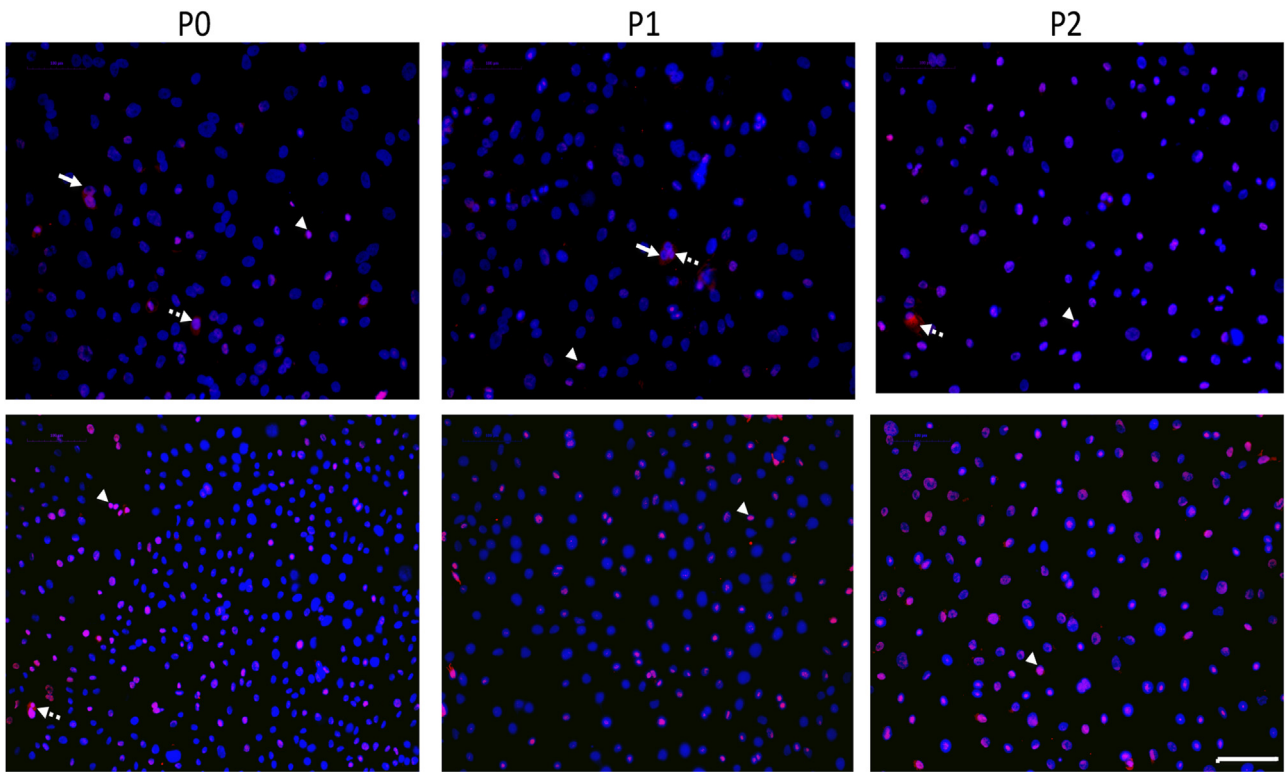


Fig. 6. hAEC *in vitro* are positive for NANOG. Representative micrographs of hAEC from reflected (upper panel) and placental amnion (lower panel), immunostained for NANOG (red) and cultured at P0-P2. The localization of NANOG can be nuclear (arrowhead), cytoplasmic (arrow) or both (dashed arrow).

also found in the cytoplasm, it is critical to examine localization within the cell rather than demonstrate the presence and/or the amount of RNA messenger. In this study, we demonstrate that OCT-4A mRNA and

protein is present in hAEC. However, our results showed different localization between tissue and cultured cells. Indeed, it has been reported that OCT-4 isoforms display different temporal and spatial

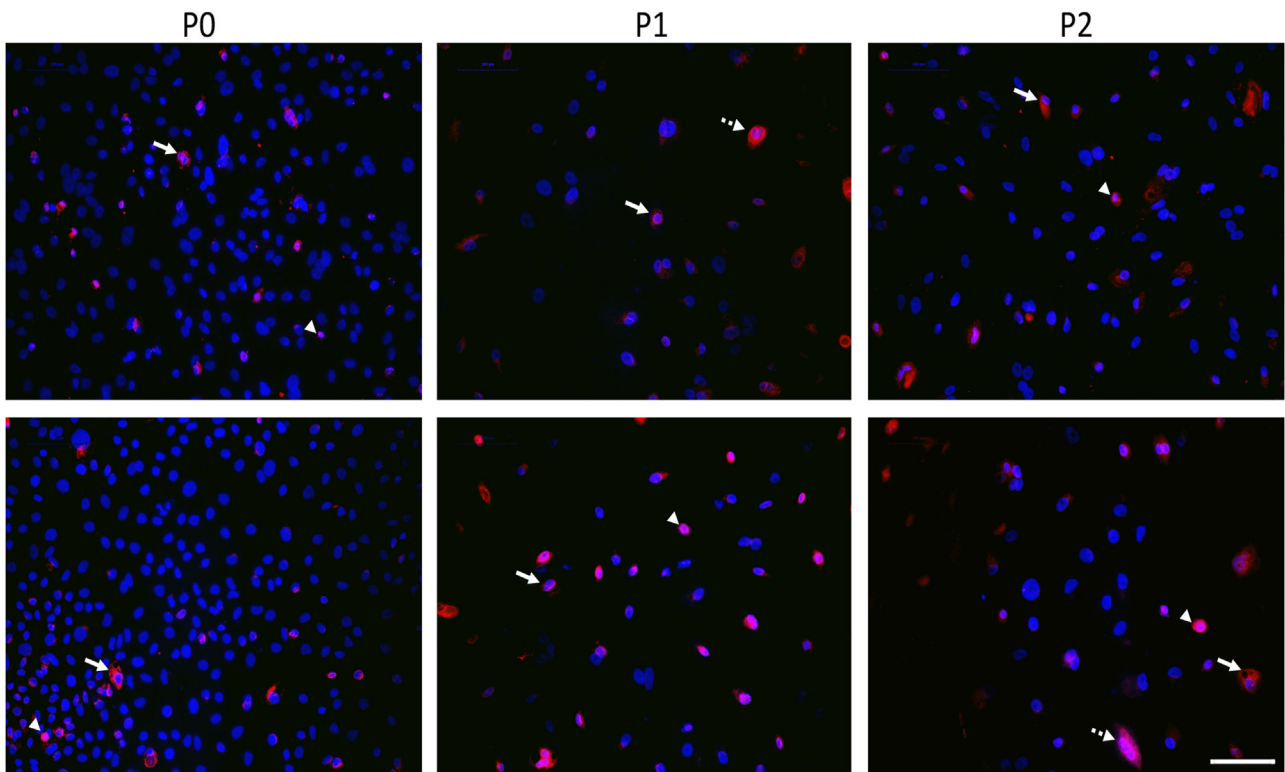


Fig. 7. hAEC *in vitro* are positive for SOX-2. Representative micrographs of hAEC from reflected (upper panel) and placental amnion (lower panel), immunostained for SOX-2 (red) and cultured at P0-P2. The localization of SOX-2 can be nuclear (arrowhead), cytoplasmic (arrow) or both (dashed arrow).

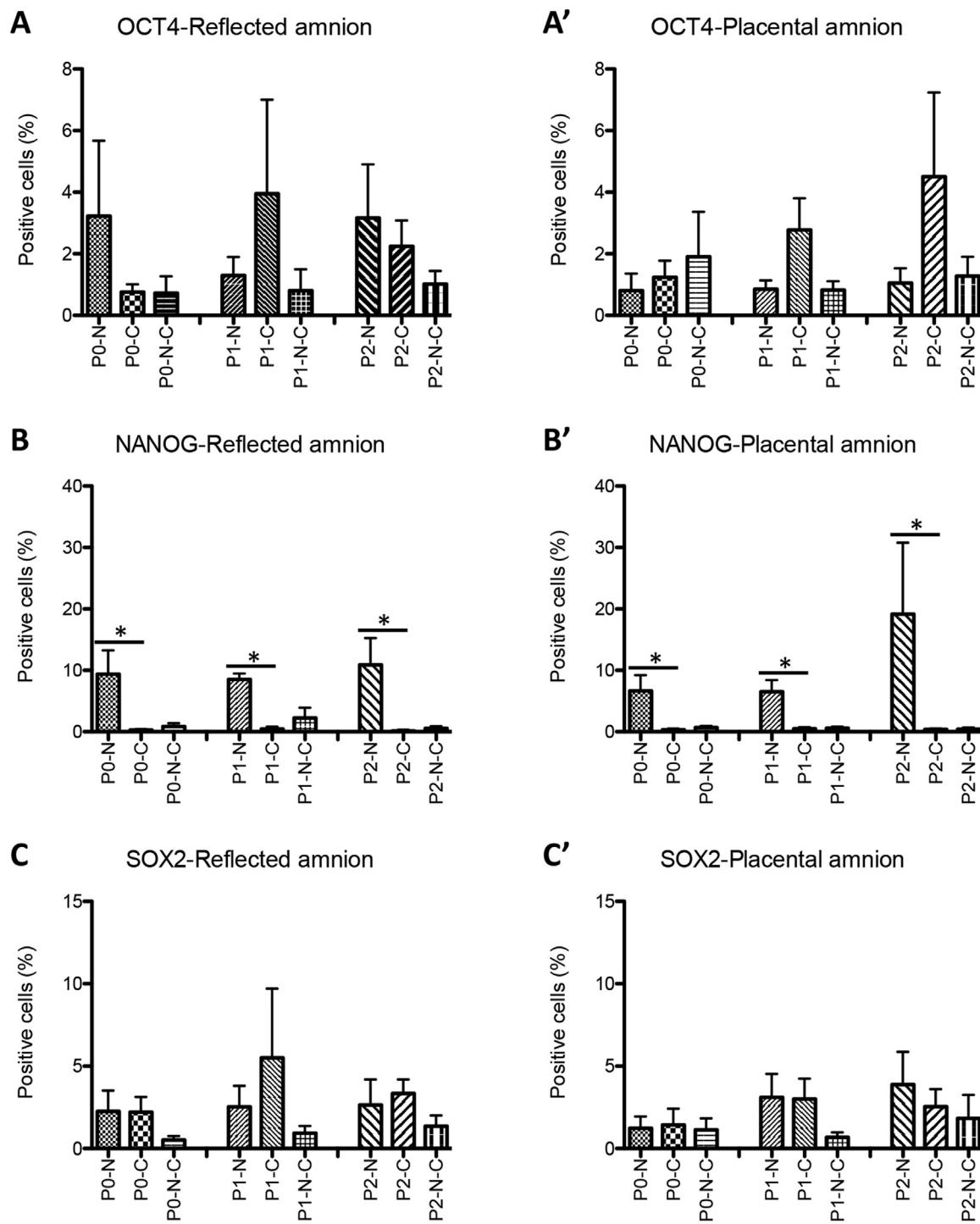


Fig. 8. Subcellular distribution of OCT-4, NANOG and SOX-2 in hAEC *in vitro*. Graphs with the percentage of hAEC from reflected (A, B, C) or placental (A', B', C') amnion with localization nuclear (N), cytoplasmic (C) or both (N-C) for OCT-4 (A), NANOG (B) and SOX-2 (C) at P0-P2.

expression during human preimplantation development [29]. Because OCT-4 operates as a transcription factor, its cytoplasmic localization suggests that OCT-4 is not involved in biological functions in amnion tissue during pregnancy.

NANOG is also a key pluripotency regulator that shows relatively lower expression levels and more significant heterogeneity among hESC populations than other core “stemness” transcription factors such as OCT-4 and SOX-2 [30]. Thus, the heterogeneity in the pluripotency transcription factor-positive cells found within the different regions of amnion *in vitro* may arise *via* different transcriptional regulation, as well

as post-transcriptional events such as protein modifications and cell cycle dynamics [31,32]. In particular, the translocation of transcription factors must be tightly regulated to control their functions, and cellular locations are important clues to understanding their physiology. It is becoming clear that cellular factors are involved in selective nuclear transport and play critical roles in cell differentiation and organism development [33]. Accordingly, it has been reported in pluripotent cells that phosphorylation of OCT-4 increases its stability and facilitates its nuclear localization and its interaction with SOX-2, which promotes the transcription of NANOG [34]. A nuclear to cytoplasm shuttling of OCT-

4 also was identified in differentiated cells, an event associated with OCT phosphorylation [35]. The nucleocytoplasmic shuttling of SOX transcription factors plays a crucial role in their regulation during development [36]. Our result suggested that these mechanisms could be present in hAEC, however this possibility have been not explored yet.

Whether the different subpopulations of hAEC have distinct roles is a topic that requires further exploration.

Hence, it is essential to gain a better understanding of the molecular mechanisms mediating the integration of signals from the niche and how these signals modify hAEC pluripotency transcription factors *in vitro*. In summary, identifying and characterizing the subpopulations within hAEC cultures can increase our understanding of these cells and have direct impact in their possible utility in regenerative medicine.

Acknowledgments

Guadalupe García-López is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Daniela Avila-Gonzalez received fellowship 231731 from CONACYT. We thank Adriana González, Francisco Camacho, Michael Jeziorski and Jessica González for their excellent technical assistance. Finally, we are very grateful to Veronica Jimenez-Jacinto for Bioinformatics support that was performed in the Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática at the Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, CONACYT 260481, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Funding

Our research was supported by grants from Instituto Nacional de Perinatología de México (21041 and 21081), CONACYT (140917, 130627 and 252756) and UNAM-DGAPA-PAPIIT IN202818.

Disclosure of interests

The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.yexcr.2018.12.007](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.12.007).

References

- [1] G. Bourne, The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function, *Postgrad. Med. J.* 38 (1962) 193–201.
- [2] S. Ilancheran, Y. Moodley, U. Manuelpillai, Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 30 (2009) 2–10.
- [3] M.N. Shahbazi, A. Jedrusik, S. Vuoristo, G. Recher, A. Hupalowska, V. Bolton, N.M. Fogarty, A. Campbell, L.G. Devito, D. Ilic, Y. Khalaf, K.K. Niakan, S. Fishel, M. Zernicka-Goetz, Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016) 700–708.
- [4] A. Deglincerti, G.F. Croft, L.N. Pietila, M. Zernicka-Goetz, E.D. Siggia, A.H. Brivanlou, Self-organization of the *in vitro* attached human embryo, *Nature* 533 (2016) 251–254.
- [5] A. Bryzek, P. Czekaj, D. Plewka, H. Komarska, M. Tomsia, M. Lesiak, A.L. Sieron, J. Sikora, K. Kpaczka, Expression and co-expression of surface markers of pluripotency on human amniotic cells cultured in different growth media, *Ginekol. Pol.* 84 (2013) 1012–1024.
- [6] I.L. Garcia-Castro, G. Garcia-Lopez, D. Avila-Gonzalez, H. Flores-Herrera, A. Molina-Hernandez, W. Portillo, E. Ramon-Gallegos, N.F. Diaz, Markers of pluripotency in human amniotic epithelial cells and their differentiation to progenitor of cortical neurons, *PLoS One* 10 (2015) e0146082.
- [7] G. Garcia-Lopez, I.L. Garcia-Castro, D. Avila-Gonzalez, A. Molina-Hernandez, H. Flores-Herrera, H. Merchant-Larios, F. Diaz-Martinez, Human amniotic epithelium (HAE) as a possible source of stem cells (SC), *Gac. Med. Mex.* 151 (2015) 66–74.
- [8] S. Ilancheran, A. Michalska, G. Peh, E.M. Wallace, M. Pera, U. Manuelpillai, Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential, *Biol. Reprod.* 77 (2007) 577–588.
- [9] M. Izumi, B.J. Pazin, C.F. Minerini, J. Gerlach, M.A. Ross, D.B. Stolz, M.E. Turner, R.L. Thompson, T. Miki, Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion, *J. Reprod. Immunol.* 81 (2009) 39–43.
- [10] T. Miki, T. Lehmann, H. Cai, D.B. Stolz, S.C. Strom, Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells, *Stem Cells* 23 (2005) 1549–1559.
- [11] T. Miki, K. Mitamura, M.A. Ross, D.B. Stolz, S.C. Strom, Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion, *J. Reprod. Immunol.* 75 (2007) 91–96.
- [12] K.P. Benirschke, *Anatomy and pathology of the placental membranes, in: Pathology of the Human Placenta*, New York, 2000.
- [13] A. Banerjee, A. Weidinger, M. Hofer, R. Steinborn, A. Lindenmair, S. Hennerbichler-Lugscheider, J. Eibl, H. Redl, A.V. Kozlov, S. Wolbank, Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane, *Placenta* 36 (2015) 1329–1332.
- [14] Y.M. Han, R. Romero, J.S. Kim, A.L. Tarca, S.K. Kim, S. Draghici, J.P. Kusanovic, F. Gotsch, P. Mittal, S.S. Hassan, C.J. Kim, Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion, *Biol. Reprod.* 79 (2008) 954–961.
- [15] S.Y. Kim, R. Romero, A.L. Tarca, G. Bhatti, J. Lee, T. Chaiworapongsa, S.S. Hassan, C.J. Kim, miR-143 regulation of prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 in the amnion: implications for human parturition at term, *PLoS One* 6 (2011) e24131.
- [16] T. Miki, F. Marongiu, K. Doriko, E.C. Ellis, S.C. Strom, Isolation of amniotic epithelial stem cells, *Current Protocols in Stem Cell Biology* Chapter 1, Unit 1E 3, 2010.
- [17] D. Avila-Gonzalez, E. Vega-Hernandez, J.C. Regalado-Hernandez, J.F. De la Jaradiaz, I.L. Garcia-Castro, A. Molina-Hernandez, E.R. Moreno-Verduzco, G. Razo-Aguilera, H. Flores-Herrera, W. Portillo, N.E. Diaz-Martinez, G. Garcia-Lopez, N.F. Diaz, Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos, *Stem Cell Res.* 15 (2015) 322–324.
- [18] J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science* 282 (1998) 1145–1147.
- [19] A.D. Bednar, M.K. Beardall, R.A. Brace, C.Y. Cheung, Differential expression and regional distribution of aquaporins in amnion of normal and gestational diabetic pregnancies, *Physiol. Rep.* 3 (2015).
- [20] S.J. Bowden, J.F. Emly, S.V. Hughes, G. Powell, A. Ahmed, M.J. Whittle, J.G. Ratcliffe, W.A. Ratcliffe, Parathyroid hormone-related protein in human term placenta and membranes, *J. Endocrinol.* 142 (1994) 217–224.
- [21] J. Kim, M.M. Pitlick, P.J. Christine, A.R. Schaefer, C. Saleme, B. Comas, V. Cosentino, E. Gadov, J.C. Murray, Genome-wide analysis of DNA methylation in human amnion, *Sci. World J.* 2013 (2013) 678156.
- [22] S.J. Morrison, A.C. Spradling, Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life, *Cell* 132 (2008) 598–611.
- [23] F. Ferraro, C.L. Celso, D. Scadden, Adult stem cells and their niches, *Adv. Exp. Med. Biol.* 695 (2010) 155–168.
- [24] J.S. Yu, W. Cui, Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination, *Development* 143 (2016) 3050–3060.
- [25] L. Armstrong, O. Hughes, S. Yung, L. Hyslop, R. Stewart, I. Wappler, H. Peters, T. Walter, P. Stojkovic, J. Evans, M. Stojkovic, M. Lako, The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFκB signaling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 1894–1913.
- [26] A.B. Prowse, F. Chong, P.P. Gray, T.P. Munro, Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies, *Stem Cell Res.* 6 (2011) 1–12.
- [27] J. Kim, K. Zhao, P. Jiang, Z.X. Lu, J. Wang, J.C. Murray, Y. Xing, Transcriptome landscape of the human placenta, *BMC Genom.* 13 (2012) 115.
- [28] M. Alhomrani, J. Correia, M. Zavou, B. Leaw, N. Kuk, R. Xu, M.I. Saad, A. Hodge, D.W. Greening, R. Lim, W. Sievert, The human amnion epithelial cell secretome decreases hepatic fibrosis in mice with chronic liver fibrosis, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 748.
- [29] G. Cauffman, I. Liebaers, A. Van Steirteghem, H. Van de Velde, POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and pre-implantation embryos, *Stem Cells* 24 (2006) 2685–2691.
- [30] J. Wu, E.S. Tzanakakis, Contribution of stochastic partitioning at human embryonic stem cell division to NANOG heterogeneity, *PLoS One* 7 (2012) e50715.
- [31] V. Espinosa Angarica, A. Del Sol, Modeling heterogeneity in the pluripotent state: a promising strategy for improving the efficiency and fidelity of stem cell differentiation, *BioEssays: news and reviews in molecular, Cell. Dev. Biol.* 38 (2016) 758–768.
- [32] M.E. Torres-Padilla, I. Chambers, Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage, *Development* 141 (2014) 2173–2181.
- [33] N. Yasuhara, Y. Yoneda, Importins in the maintenance and lineage commitment of ES cells, *Neurochem. Int.* 105 (2017) 32–41.
- [34] Y. Lin, Y. Yang, W. Li, Q. Chen, J. Li, X. Pan, L. Zhou, C. Liu, C. Chen, J. He, H. Cao, H. Yao, L. Zheng, X. Xu, Z. Xia, J. Ren, L. Xiao, L. Li, B. Shen, H. Zhou, Y.J. Wang, Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells, *Mol. Cell* 48 (2012) 627–640.
- [35] F. Ferro, R. Spelat, F. D'Aurizio, E. Puppato, M. Pandolfi, A.P. Beltrami, D. Cesselli, G. Falini, C.A. Beltrami, F. Curcio, Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4 dynamics, *PLoS One* 7 (2012) e41774.
- [36] Z.Y. She, W.X. Yang, Nucleocytoplasmic shuttling of SOX14A and SOX14B transcription factors, *Oncotarget* 8 (2017) 46955–46968.

Human amniotic epithelium (HAE) as a possible source of stem cells (SC)

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

¹Department of Cellular Biology, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, D.F.; ²Department of Biochemistry and Cellular Biology, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, D.F.; ³Department of Cellular Biology and Physiology, Institute of Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Abstract

There have been major recent advances in the field of developmental biology due to the investigation on stem cells (SC). Stem cells are characterized by their capacity of auto-renewal and differentiation to different cellular phenotypes. Based on the developmental stage, they can be classified into two different types: embryonic SCs and adult SCs. It has been widely reported that several problems need to be resolved before their possible clinical applications. As a result, fetal membranes have been suggested as an alternative source of SCs. In the human amniotic epithelium, the presence of markers of pluripotent SC's has been reported, and its capacity as a feeder layer for expansion of different SC types. Also, fetal membranes are a discarded product after delivery, and thus there are not any ethical issues related to its use. In conclusion, the human amniotic epithelium can be a strong candidate for regenerative medicine. (Gac Med Mex. 2015;151:61-8)

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

KEY WORDS: Stem cells. Human fetal membranes. Human amniotic epithelium cells.

Introduction

Research on embryonic stem cells (ESCs) has importantly contributed to the recent advance in the fields of developmental and cell biology. Also, due to their wide differentiation capability, this type of cells have raised interest on and kept the promise of their possible use in cell-replacement therapies. However, there are serious problems that remain to be solved before translating ESCs use from basic to clinical research. An example of such a problem is their probability to

form tumors when these cells are grafted in an undifferentiated stage¹, as well as the ethical issues their derivation entails². Likewise, the use of adult stem cells (ASCs), obtained from tissues of adult organisms, e.g. bone marrow, brain, or muscles, has been suggested. Although these cells have been studied, their extraction is difficult and their obtained number is insufficient for use in cell-replacement therapies. Additionally, ASCs show limited proliferation and plasticity compared with ESCs³, which reveals the need of alternative SC sources, such as the human amniotic epithelial cells (hAECs)^{4,5}, since they show a series of unique features⁶. Therefore, this paper focuses on hAECs as a possible source of SCs and hAEC potential use in this interesting research area.

Correspondence:

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

Date of reception: 22-07-2013
Date of acceptance: 19-05-2014

Table 1. Stem cells classification based on their differentiation potential

Classification	Differentiation potential
Totipotent	Capability to form all lineages of the organism; in mammals, only the zygote is totipotent
Pluripotent	Capability to form all the embryo lineages, including germ cells; for example, ESCs
Multipotent	Potential to form cells restricted to an embryonic layer in particular; for example, neural SC, which will differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes
Unipotent	Cells that form a single specific cell type; for example, epithelial SC

Modified from Jaenisch et al.⁶⁸

SCs

SCs are characterized by their dedifferentiation and potential to auto-renew and differentiate into a variety of specialized cell types. SCs are present in several tissues during embryonic stages as well as in adult animals, and can be classified according to their differentiation potential (Table 1).

On the other hand, the classification based on their developmental stage at isolation assort SCs as ESCs or ASCs.

ESCs

In 1981, the Martin Evans and Gail Martin groups isolated pluripotent cell lines from the blastocysts of mouse pre-implantation for the first time, and named them embryonic stem cells (ESCs)^{7,8}. Derivation of these cells was achieved growing the inner cell mass of the blastocyst on a mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder layer of 14 days of gestational age. The fibroblasts secreted soluble factors that allowed for cells of the inner cell mass to be preserved *in vitro* at a pluripotent stage, thus allowing the obtainment of these cell lines. Mouse-derived ESCs are currently among the most widely studied SCs and are characterized by presenting large nuclei and small cytoplasm, growing in compact colonies, having high telomerase activity (telomerase is associated with the capability for cell proliferation, protection and chromosome stabilization)⁹, and showing a normal karyotype

(i.e., only a small proportion present chromosomal abnormalities). Furthermore, these cells can be preserved *in vitro* without an apparent loss of their self-renewal and differentiation capabilities. ESCs express molecular markers such as the tissue-unspecific alkaline phosphatase (an enzyme also present in germ line cells), transcriptional regulatory factors that maintain the cells in an undifferentiated state (octamer-binding transcription factor 4 [Oct-4], sex-determining region Y (SRY)-box 2 [Sox2] and Nanog) and transmembrane proteins (stage-specific embryonic antigen [SSEA-1], tumor rejection antigen [TRA-1-60]). This way, preserved in conditions that favor their pluripotent status, these cells do not present morphological or molecular characteristics of differentiated cells.

With procedures similar to those used to derive mouse ESCs, the group of Thompson generated non-human primate (Rhesus monkey)¹⁰ and, later, human ESCs. In 1988, they reported the isolation and culture of five human embryonic stem cell (hESC) lines obtained from embryos of less than a gestational week coming from *in vitro* fertilization clinics and donated by parents for this specific purpose. As a result, when cultured *in vitro*, rounded with well-defined edges, compact and flat colonies, with cells presenting a prominent nucleus and a high nucleus-cytoplasm ratio and that maintained an unlimited proliferation capability, were obtained¹¹.

Once an ESC line is obtained, its pluripotent state must be verified by means of a series of laboratory tests. In cells obtained from mouse, its pluripotency can be demonstrated by injecting ESCs into blastocysts of the same species and observing their contribution to every tissue of the animal, spermatozooids and oocytes included¹². Thus, chimeric organisms with a functional germ line are obtained¹³. Pluripotent state has also been demonstrated by means of tetraploid complementation, through the production of 4n blastocysts by cell fusion and ESCs introduction to the blastocyst. Since 4n cells are not able to produce somatic cells, the resulting organisms are entirely formed by ESC derivatives¹⁴. A third form to test the ESC pluripotent capability is by forming differentiated cells *in vitro*, either directly or indirectly. The first method consists in removing the signals that allow for self-renewal; consequently, cells differentiate spontaneously. In the second method, the differentiation protocols allow cell exposure to specific culture conditions and growth factors to induce them into a particular cell lineage¹⁵.

In the case of the hESCs, ethical issues prevent the production of chimeric animals or tetraploid comple-

mentation. Therefore, the highest standard of evidence is the formation of teratomas (tumors with ectoderm, endoderm and mesoderm cell lineages) by injecting the hESC into immunodeficient mice¹⁶, and the demonstration that cells are able to differentiate *in vitro* into tissues of the three embryonic layers. The recognition of the ESC identity has been achieved by using the above mentioned tests together with molecular markers (Oct-4, Sox-2, Nanog and alkaline phosphatase) and surface antigens exclusive to this cell type (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-18). However, research with hESC entails ethical and political controversies to be solved before its inclusion in clinical research².

Other types of pluripotent cells, such as epiblast SC and induced pluripotent stem cells (iPSC), have also been described. However, due to space limitations, we will not review them in detail. We refer the reader to the works published by Chenoweth et al.¹⁷, Stadtfeld et al.¹⁸, Teoh et al.¹⁹ and Wu et al.²⁰.

ASCs

SCs from adult tissue are embedded in tissue and organ differentiated cells, and their main role is to maintain and repair their niches. These niches represent a specialized tissue microenvironment where SCs establish complex and reciprocal interactions with supporting cells and the extracellular matrix through adherent unions mediated by cadherins, catenins, integrins and selectins and their ligands, adhesion molecules, growth factor and chemokines receptors, etc.²¹. ASCs have also a role in the secretion of various soluble factors functioning as non-adhesion-mediated cell interaction mechanisms (Wnt/frizzled, Notch/Delta-Jagged) that contribute to their restricted mobility and adoption of either a quiescent or an active state within their niche^{22,23}.

These SCs are usually multipotent, since they have certain compromise to form cells of the same cell type of the tissue embedding them. This cell type has been identified in several organs, such as brain, bone marrow, skeletal muscle, skin, intestine, etc. Though, the ASCs number is very limited, they are difficult to find and isolate, and their differentiation range is restricted to the cell type of their niche, as previously mentioned^{24,25}.

Due to the above-mentioned disadvantages associated to the obtainment and use of both, hESC and ASC, alternative sources like the human extra-embryonic tissues have been examined.

Human extra-embryonic tissues

The extra-embryonic tissues comprise the placenta, umbilical cord and fetal membranes. A term placenta weighs between 400 and 600 g²⁶, and has a discoid shape, with a 15-20 cm diameter and 2-3 cm thickness. It has two sides: the first known as chorionic plate has a fetal origin, faces the amniotic cavity, and is formed by the amnion and the chorion; the other side, is named basal plate, is formed by the decidua (basal and parietal), and has a maternal origin^{27,28}. The placenta acts as a mother-fetus interphase, involved in gas, nutrients and waste products exchange. It also works as an endocrine organ producing hormones and growth factors that regulate both fetal growth and maternal physiology²⁹. The umbilical cord consists of a connective mucous tissue known as Warthon's jelly that extends along the amniotic epithelium and covers the umbilical vessels. Its main function is to prevent vessel compression, torsion or flexion, to allow the bi-directional blood flow between maternal and fetal circulation that the vessels provide³⁰. Finally, fetal membranes are formed by two attached membranes, the amnion and the chorion (Fig. 1).

Human fetal membranes

The amniotic membrane is a translucent biological membrane without nerves, muscles or lymphatic vessels. The amnion thickness ranges from 0.02 to 0.5 mm and consists of three histological layers: epithelial layer, basal layer and avascular mesenchymal tissue. The inner layer, adjacent to the amniotic fluid, is formed by a homogeneous mantle of cuboidal cells firmly attached to the basal membrane, which, in turn, is attached to an acellular layer composed by collagen, types I, II and V. A stromal cell lining composed of fibroblasts and scarce macrophages embedded in a reticular-fiber mesh covers this layer externally. The most external, intermediate or spongy layer considerably varies in thickness, and is rich in elastin, hydrated proteoglycans (especially perlecan), glycoproteins and type III collagen fibers that separate amnion from chorion. The chorion is the thickest histological structure among the fetal membranes and holds more cellularity than the amnion. The final part of the chorion is interlocked with the uterine decidua.

Particularly, hAECs display microvilli on their apical surface and perform an intra- and trans-cellular secretory function. Additionally, it has been described a large irregular nucleus with intra-cytoplasmic organelles

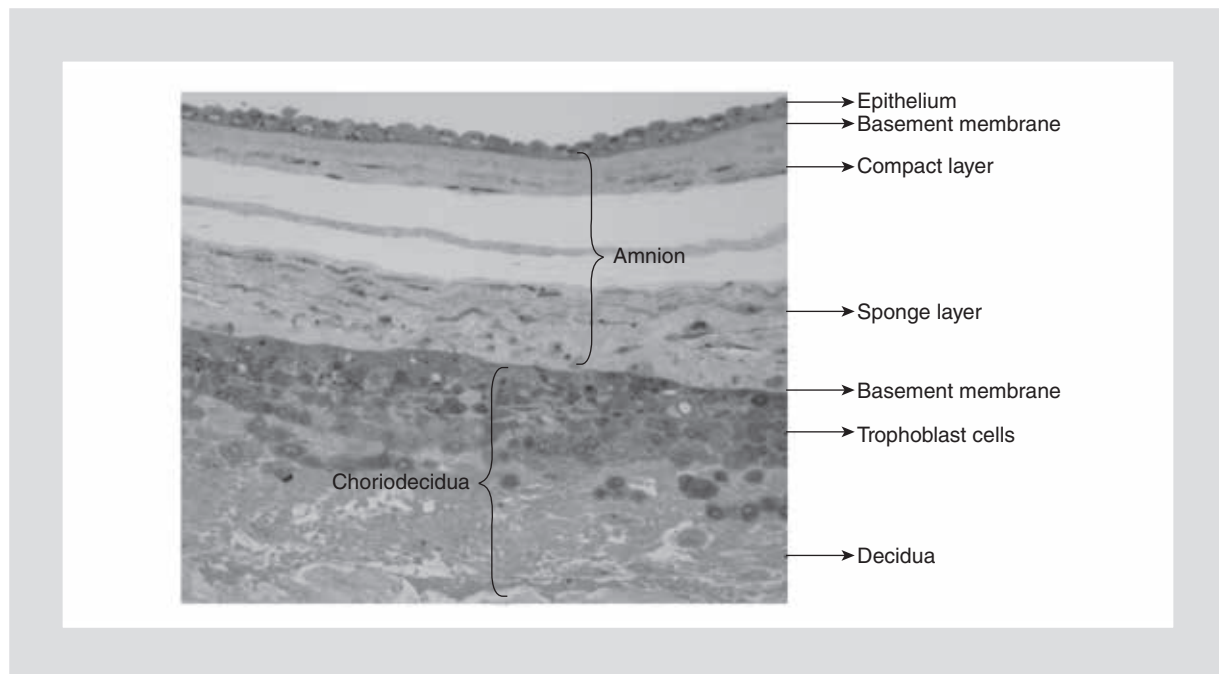


Figure 1. Semifine cross-section (1 μm) of a 40-gestational-week human fetal membrane obtained from elective cesarean, included in EPON and stained with 0.5% toluidine blue. The image shows the two fetal-membrane constitutive regions: amnion and chorion (20X) (modified from the Guadalupe García Gómez Masters Degree thesis, UNAM, 2007).

and pinocytic vesicles. One of the hAECs basic functions is to provide the developing embryo with an environment to be suspended, where the embryo will be able to grow free of the pressure exerted by structures surrounding its body and protected against desiccation. In addition, multiple metabolic functions, such as water and soluble material transportation and production of factors without a specific biologic function, including vasoactive peptides, growth factors and cytokines, have been described³¹. Interestingly, presence of SCs among hAECs has been suggested, as described later.

Embryonic development of human amniotic epithelium

Unlike other structures forming the placenta, the amnion is generated around the 8th day after fertilization, before gastrulation. In this period, the blastocyst is implanted in the endometrial stroma and the inner cell mass is differentiated into two layers: one composed by cuboidal cells (hypoblast) and other of cylindrical cells (epiblast). The three embryonic cell layers that make up the embryo originate in the epiblast, whereas the hypoblast generates the extra-embryonic endoderm³². Within the epiblast, a small cavity (the amniotic cavity)

appears, and the adjacent cells (amnioblasts) form the amniotic epithelium. The development of the amnion from the epiblast is very important, since this tissue has been suggested to contain a SC population^{5,33}.

In vitro derivation and preservation of hAECs

Different hAEC *in vitro*-derivation protocols have been reported. These cells are usually obtained from 38-to-39-gestational-week term placentas by means of elective cesarean section, after informed consent is obtained. It is important pointing out that women must not be in labor or have premature membrane rupture, chorioamnionitis or chromosomal abnormalities for tissue donation. hAEC-isolation protocols consist in mechanically detaching the amniotic membrane from the chorion, washing it with a buffering solution, then incubating it at 37 °C with trypsin at different times and different concentrations^{5,34-40} or using dispase 1.2 U/ml and scraping the tissue to remove the cells³⁵. Once the hAECs are obtained, they are cultured at different densities per cm^2 ranging from 6×10^4 to 1×10^5 , in supplemented Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and in the presence of epidermal growth factor (EGF) at a 10 ng/ml concentration^{37,41,42}. It is worth

mentioning that the composition of this medium is very similar to the one used in ESC^{43,44}.

Finally, derivation of hAEC in xenocontaminant-free medium (free of animal derivatives) has been reported, thinking on its possible application in the clinic. This way, modified reagents have been employed, which include Trypzean as digestion solution (it does not contain contaminants traditionally found in bovine or porcine trypsin) and EpiLife medium (serum-free basal medium)⁴⁵.

Molecular and cell-surface markers found in hAECs

When stained with hematoxylin-eosine *in vitro*, hAECs present an homogeneous appearance^{37,46}, but express a heterogeneous phenotype when membrane markers are determined, with different antigenic expression degrees. These findings would indicate the presence of cell subpopulations, probably SCs in conjunction with more differentiated cells. This way, the cells express a large variety of surface antigens (Table 2).

Interestingly, they express ESC-associated molecular markers such as Oct-4, Sox-2, Nanog, reduced expression 1 (Rex-1), fibroblast growth factor-4 (FGF-4), cryptic family 1 (CFC-1), developmental pluripotency-associated protein 3 (DPPA-3) and c-kit^{5,35,37,47}. These transcription factors play an important role to maintain the pluripotent state of the cells, through complex networks between them^{48,49}. In addition, *in vitro* cultured hAECs have been reported to be tissue non-specific alkaline phosphatase-positive (ESC marker)³⁵. Finally, hAECs have been shown to express low or moderate levels of the polymorphic antigens HLA A-B-C (class Ia), lack HLADR (class II)⁴¹ and express HLA-G⁵⁰, data that can explain the low immunogenic of the human amniotic membrane and the absence of rejection when it is transplanted^{51,52}.

Additionally, when cultured *in vitro*, hAECs express markers specific to each embryonic layer. Regarding the ectoderm, nestin, microtubule-associated protein (MAP-2), intermediate neurofilament protein, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron-specific enolase have been identified³⁷. Endoderm markers are: globin transcription factor (GATA) binding protein 4 (GATA-4), hepatocyte nuclear factor 3b (HNF-3b), a-fetoprotein and glucose transporter (GLUT-2). Finally, mesoderm markers are: atrial natriuretic peptide, heavy and light chain myosin, actin, etc., all of them associated with the cardiomyocytic lineage³⁷. Together, these data

Table 2. Expression of surface antigens present in the hAECs

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

CCR-4: chemokine receptor type 4; CD: cluster of differentiation; GCTM-2: germ cell tumor marker; CK7: cytokeratine 7; EGFR: epidermal growth factor receptor; HLA: human leukocyte antigen.

suggest a pluripotent state as well as a wide heterogeneity of the hAECs.

Pluripotency tests in hAECs

As previously mentioned, there is a series of laboratory tests to demonstrate the pluripotent state of the SCs. In the case of hAECs, Tamagawa et al., in 2004, were the first to describe their pluripotent features, by creating xenogenic chimeres *in vitro* from cells isolated from human amnion with mouse embryonic cells, and demonstrating the contribution of hAECs to the

Table 3. hAEC *in vitro* differentiation into specialized cells of the three embryonic layers

Reference	Lineage		
	Endoderm	Mesoderm	Ectoderm
Miki et al. ³⁷	Pancreatic cells	Cardiomyocytes	Neural cells
Ilancheran et al. ⁵	Pancreatic cells	Myocytes	Neural cells
	Hepatic cells	Osteocytes Adipocytes Cardiomyocytes	
Kim et al. ³⁶	–	Adipocytes Osteocytes Chondrocytes	Neural cells
Bilic et al. ³⁵	–	Osteocytes Myocytes Adipocytes	–
Murphy et al. ⁴⁵	Pulmonary epithelium cells	Osteocytes Adipocytes	Neural cells Glial cells
Pratama et al. ⁴¹	Alveolar epithelium cells Pancreatic cells Hepatic cells	Osteocytes Chondrocytes	–
Marongiu et al. ⁷⁶	Hepatic cells	–	–
Fant et al. ⁷⁷	–	Cardiomyocytes	–

formation of all three germ layers (endoderm, ectoderm and mesoderm) through the formation of embryoid bodies⁵³.

The capability of hAECs to form clonal colonies (a property of ESCs) in low-density cultures (30-50 cells per cm²) has also been reported^{5,41}. However, and in contrast to hESCc, these cells are not capable of forming teratomas: when being inoculated at a 5 x 10⁵ cell-density in testicles of immunodeficient mouse, no formation of tumors was reported after 10 weeks⁵. Miki et al. injected hAEC at 1 x 10⁶ into the liver and rear legs of mice with severe combined immunodeficiency (SCID); the animals were examined at 7 months looking for any evidence of tumor growth, but the authors did not report any finding³⁷. These data demonstrate that, when being injected to immunodeficient mice, hAECs are unable to form teratomas, a property that would be very useful in the clinical setting, since one of the biggest problems with the use of hESCc is the possible development of teratomas when being transplanted in undifferentiated state.

In spite of the loss of teratoma formation, hAECs have been differentiated *in vitro* into endoderm, mesoderm and ectoderm derivatives (Table 3). The techniques used to perform the phenotype determination involved polymerase chain reaction (PCR) and immunocytochemistry.

hAECs as a feeder layer of pluripotent cells

hAECs, as opposed to hESCc, do not require a second cell type as a feeder layer for their growth. They adhere to plastic and to flasks covered with basement membrane or other materials in conventional media, as previously mentioned. However, they have been proposed as a substitute niche for the preservation of SCs of different origins⁵⁴. This way, limbal epithelial cells⁵⁵, epiblast-derived SCs (EpiSC)⁵⁶, iPSC^{57,58} and spermatogonial stem cells (SGSC)⁵⁹ have been shown to be successfully cultured using hAEC as culture substrate. In the particular case of SGSCs, the expression of Nanog and Oct-4 is higher in cells cultured in hAEC than in those cultured in MEF or with other cell type⁶⁰. Furthermore, Lai's group used hAEC to maintain the undifferentiated state of murine ESC, and reported that the ESCs expressed 3-5 times more FGF, Oct-4, Nanog, Sox-2 and Rex-1, than cells cultured in MEF, using the reverse transcription technique followed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The authors suggested that these effects might be caused by production of leukemia inhibitory factor (LIF)⁶¹. On the other hand, Liu et al. reported having obtained human iPSC on hAEC, an effect mediated by micro RNA 145 when the levels of Sox-2 were increased in the reprogrammed cells⁵⁷.

Anti-inflammatory, anti-microbial and low-immune-response properties of amniotic cells

Amnion-derived cells have been considered an ideal tissue for allogeneic transplantation, based on their anti-inflammatory and low immune response effects. hAECs have been reported to express several anti-angiogenic markers and anti-inflammatory proteins including the interleukin 1 receptor-agonist, metalloproteases 1, 2, 3, 4 and 5 inhibitors and interleukin 10⁶². In addition, they suppress the tumor growth factor b isoforms and its type II receptor, which triggers collagen deposit in the site of lesion and fibrosis⁶³.

Beta defensins have also been described to be a group of antimicrobial peptides secreted by epithelial cells of the mucosae and the amnion, which are integral part of the innate immune system⁶⁴.

With regard to low immune response, no rejection signs have been reported when the amniotic membrane has been grafted in healthy volunteers without underlying diseases⁶⁵. On the other hand, amnion cells express the non-polymorphic antigen HLA-G, but they lack polymorphic antigens HLA-A (class A) and HLA-DR (class B)⁶⁶. This characteristic confers them an immune advantage by decreasing the risk of rejection when being transplanted.

The human amniotic membrane is an inexpensive biological source of matrix for cell culture. Additionally, expression of several growth factors and cytokines (EGF, keratinocyte growth factor [KGF], hepatocyte growth factor [HGF], basic fibroblastic growth factor [bFGF], TGF- α , transforming growth factor- β [TGF- β], bone morphogenetic growth protein-4 [BMP-4], etc.) has been described⁶⁷.

Conclusions

The information here presented suggests that hAECs have similar characteristics to pluripotent SCs, which makes them excellent candidates to be used for cell-replacement therapies. In addition, hAEC derivation does not entail ethical issues, these cells do not form teratomas when transplanted at an undifferentiated state, do not present immune response and have anti-inflammatory and antimicrobial properties. Nevertheless, further investigation to enable their characterization is required since hAECs form heterogeneous populations, and the reported protocols for their isolation are diverse.

Acknowledgements

The present work was supported by CONACYT (140917 and 130627) and INPER (212250-21041 and 212250-21081), granted to Fabián Díaz-Martínez. Irma Lydia García-Castro (213945) and Daniela Ávila-González (231731) are CONACYT scholarship.

Guadalupe García-López is a student of the Doctorate in Biomedical Sciences Program at UNAM. We are thankful to Dr. Federico Martínez-Montes and Dr. Héctor Mayani-Viveros for their valuable review and suggestions on this work, which contributed to enhance its quality.

References

1. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(2): 189-92.
2. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.* 2009;30(3):204-13.
3. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-16.
4. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology.* 2008;58(1):33-42.
5. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod.* 2007;77(3):577-88.
6. Chen CP, Liu SH, Huang JP, et al. Engraftment potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells after in utero transplantation in rats. *Hum Reprod.* 2009;24(1):154-65.
7. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-6.
8. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7634-8.
9. Pereira Fde A, Tavares RL, Camargos AF, da Silva Filho AL. Telomerase activity alterations in sequential passages of mouse embryonic stem cells. *Cell Biol Int.* 2012;36(8):755-7.
10. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7844-8.
11. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391): 1145-7.
12. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* 1984;309(5965):255-6.
13. Artus J, Hadjantonakis AK. Generation of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2011;693:37-56.
14. Lin CJ, Amano T, Zhang J, Chen YE, Tian XC. Acceptance of embryonic stem cells by a wide developmental range of mouse tetraploid embryos. *Biol Reprod.* 2010;83(2):177-84.
15. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006;27(2):208-19.
16. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010;143(4):508-25.
17. Chenoweth JG, McKay RD, Tesar PJ. Epiblast stem cells contribute new insight into pluripotency and gastrulation. *Dev Growth Differ.* 2010;52(3): 293-301.
18. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010;24(20):2239-63.
19. Teoh HK, Cheong SK. Induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Malays J Pathol.* 2012;34(1):1-13.
20. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):497-505.
21. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9499-503.
22. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med.* 2007;58:299-312.
23. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-68.
24. Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2007;25(5):665-77.

25. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.
26. López-Cruz G M-RJ, Gaván-Espinosa H, Sosa-Vásquez J, Reyes-Hernández U. Estudio de la placenta. I. Correlación: Peso del recién nacido y peso placentario. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*. 2009;26(1):8-12.
27. Bourne G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J*. 1962;38:193-201.
28. Benirschke K KP. *Anatomy and Pathology of the placental membranes*. En: *Pathology of the human Placenta*. 4.^a ed. Nueva York; 2000. p. 281334.
29. Fu G, Brkic J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5519-44.
30. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(11):2886-95.
31. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res*. 2012;349(2):447-58.
32. Takaoka K, Hamada H. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development*. 2012;139(1):3-14.
33. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(3):25.
34. Dunnebacke TH, Zitcer EM. Preparation and cultivation of primary human amnion cells. *Cancer Res*. 1957;17(11):1043-6.
35. Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transpl*. 2008;17(8):955-68.
36. Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(4):581-94.
37. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1549-59.
38. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 1996;209(1):9-12.
39. Venkatachalam S, Palaniappan T, Jayapal PK, Neelamegan S, Rajan SS, Muthiah VP. Novel neurotrophic factor secreted by amniotic epithelial cells. *Biocell*. 2009;33(2):81-9.
40. Yang XX, Xue SR, Dong WL, Kong Y. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparesis rats. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(20):2449-54.
41. Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, et al. Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *PLoS One*. 2011;6(11):e26136.
42. Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010;Chapter 1:Unit 1E.3.
43. Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013;153(6):1228-38.
44. Gavrillov S, Marolt D, Douglas NC, et al. Derivation of two new human embryonic stem cell lines from nonviable human embryos. *Stem Cells Int*. 2011;2011:765378.
45. Murphy S, Rosli S, Acharya R, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010;Chapter 1:Unit 1E.6.
46. Whittle WL, Gibb W, Challis JR. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*. 2000;21(4):394-401.
47. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. 2007;75(2):91-6.
48. Bibikova M, Laurent LC, Ren B, Loring JF, Fan JB. Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):123-34.
49. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 2009;136(14):2311-22.
50. Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, et al. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(2):161-71.
51. Thatte S, Gupta L. Amniotic membrane transplantation in surgically induced necrotizing scleritis with peripheral ulcerative keratitis. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2012;19(4):419-21.
52. Clare G, Suleman H, Bunce C, Dua H. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD009379.
53. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell*. 2004;17(3):125-30.
54. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(6):631-46.
55. Rendal-Vazquez ME, San-Luis-Verdes A, Yebra-Pimentel-Vilar MT, et al. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(3):513-9.
56. Chen YF, Dong Z, Jiang L, Lai D, Guo L. Mouse primed embryonic stem cells could be maintained and reprogrammed on human amnion epithelial cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(2):320-9.
57. Liu T, Cheng W, Huang Y, Huang Q, Jiang L, Guo L. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain human iPS cell pluripotency via inhibited endogenous microRNA-145 and increased Sox2 expression. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):424-34.
58. Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, et al. Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Hum Mol Genet*. 2011;20(5):962-74.
59. Liu T, Guo L, Liu Z, Cheng W. Human amniotic epithelial cells maintain mouse spermatogonial stem cells in an undifferentiated state due to high leukemia inhibitor factor (LIF) expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(4):318-26.
60. Liu T, Huang Y, Huang Q, Jiang L, Guo L, Liu Z. Use of human amniotic epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse spermatogonial stem cells via epigenetic regulation of the Nanog and Oct-4 promoters. *Acta Biol Hung*. 2012;63(2):167-79.
61. Lai D, Cheng W, Liu T, Jiang L, Huang Q, Liu T. Use of human amnion epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2009;11(2):331-40.
62. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348-52.
63. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1999;179(3):325-35.
64. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenne JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007;28(2-3):161-9.
65. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;2(8254):1003-5.
66. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*. 2005;19(7):681-93.
67. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000;20(3):173-7.
68. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-82.
69. Raisanen S, Gissler M, Saari J, Kramer M, Heinonen S. Contribution of risk factors to extremely, very and moderately preterm births - register-based analysis of 1,390,742 singleton births. *PLoS One*. 2013;8(4):e60660.
70. Minas V, Mylonas I, Schiessl B, et al. Expression of the blood-group-related antigens Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x and Lewis y in term placentas of normal, preeclampsia, IUGR- and HELLP-complicated pregnancies. *Histochem Cell Biol*. 2007;128(1):55-63.
71. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(2):300-11.
72. Banas RA, Trumpower C, Bentlejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol*. 2008;69(6):321-8.
73. Stadler G, Hennerbichler S, Lindenmair A, et al. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation in vitro. *Cytotherapy*. 2008;10(7):743-52.
74. Fatimah SS, Ng SL, Chua KH, Hayati AR, Tan AE, Tan GC. Value of human amniotic epithelial cells in tissue engineering for cornea. *Hum Cell*. 2010;23(4):141-51.
75. Maguire CT, Demarest BL, Hill JT, et al. Genome-wide analysis reveals the unique stem cell identity of human amniocytes. *PLoS One*. 2013;8(1):e53372.
76. Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, et al. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology*. 2011;53(5):1719-29.
77. Fang CH, Jin J, Joe JH, et al. In vivo differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1687-96.