



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS INSULINA POSITIVAS OBTENIDAS POR UN
PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN A PARTIR DEL EPITELIO AMNIÓTICO HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

DANIEL MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

TUTOR:

DR. NESTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ (INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA)

COMITÉ ACADÉMICO:

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNAM)

DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA , CD. MX A 15 DE DICIEMBRE DE 2021



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.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Activin B2: Activina B2

ADA: Asociación Americana de Diabetes del inglés *American Diabetes Association*

BRA: Gen *Brachyury*

CEAH Célula del Epitelio Amniótico Humano

cMYC: Gen *cMYC*

CpG: islas de dinucleotidos CpG

CT: Células Troncales

DM: Diabetes Mellitus

DM tipo 1: Diabetes Mellitus tipo1

DM tipo 2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Acido desoxirribunucleico del inglés *Deoxyribonucleic acid*

EGF: Factor de crecimiento epidermal del inglés *Epidermal Growth Factor*

FBS: Suero Fetal Bovino del inglés Fetal Bovine Serum

FGF2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos-2 del inglés Fibroblast Growth Factor-2

FGF4: Factor de Crecimiento de Fibroblastos-4 del inglés *Fibroblast Growth Factor 4*

FOXA2: Gen de la familia *Forkhead box A2*

GATA4: Gen de proteína de union *GATA Binding Protein 4*

GCG: Glucagón

HLA: Antígeno Leucocitario Humano del inglés *Human Leukocyte Antigen*

HNF1B: Gen *HNF1 homeobox B*

HNF4A: Factor Nuclear Hepatocito 4A del inglés *Hepatocyte Nuclear Factor 4A*

HNF6: Gen de la familia *HNF6 homeobox 6*

IL-1: Interlucina-1

IL-10: Interlucina-10

IL-1 β : Interlucina-1 β

IL-2: Interlucina-2

INS: Insulina

iPSC: Células Troncales Pluripotentes inducidas humanas del inglés *induced Pluripotent Stem Cells human*

ISL1: Gen *Insulin-1*

KGF: Factor de crecimiento de Queratinocitos del inglés *Keratinocyte Growth Factor*

KLF4: Gen *Kruppel like factor 4*

MAFA: Gen de la familia *MAFA* MAF BZIP Transcription Factor A

MAFB: Gen de la familia *MAFB* MAF BZIP Transcription Factor B

MHC- II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad II del inglés *Major Histocompatibility Complex II*

MHC-G: Complejo Mayor de Histocompatibilidad-G del inglés *Major Histocompatibility Complex G*

MNX1: Gen *Motor Neuron And Pancreas Homeobox 1*

MODY: Diabetes Juvenil de Aparición en la Edad Madura del inglés *Maturity-Onset Diabetes Young*

NANOG: Gen *Nanog homeobox*

NGN3: Gen *Neurogenin 3*

NKX2.2: Gen *NK2 Homeobox 2*

NKX6.1: Gen *NK6 Homeobox 6*

OCT4: Gen *Octamer-Binding Protein 4*

OSKM: *OCT4, SOX2, KLF4, NANOG*

PBS: Buffer Salino de Fosfatos del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PDX-1: Gen *Pancreatic And Duodenal Homeobox 1*

PEP-C: Péptido C

POU5F1: Gen *POU class 5 homeobox 1*

RNA: Ácido Ribonucleico del inglés *Ribonucleic acid*

RNA seq: Secuenciación de Acido Ribonucleico del inglés *Ribonucleic acid-sequencing*

RNAm: *Ribonucleic acid messenger*

RT-PCR: *Real Time- Polymerase Chain Reaction*

SHH: *Sonic-Hedgehog*

SOX-17: Gen *SRY17-Box transcription factor 17*

SOX2: Gen *SRY-Box transcription factor 2*

SOX9: Gen *SRY-Box transcription factor 9*

SRY17: Gen *SRY17-Box transcription factor 17*

SSEA-3: Antígeno Embrionario Especifico de Etapa-3 del inglés *Stage Specific Embryonic Antigen 4*

SSEA4: Antígeno Embrionario Especifico de Etapa-4 del inglés *Stage Specific Embryonic Antigen 3*

SST: Somatostatina

STZ: Streptozotocina

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β del inglés *Transforming Growth Factor β*

TRA 1-60: Antígeno de Rechazo Tumoral 1-60 del inglés *Tumor Rejection Antigen 1-60*

TRA-1-81: Antígeno de Rechazo Tumoral 1-81 del inglés *Tumor Rejection Antigen 1-81*

TSC: Células troncales del Teratocarcinoma del inglés *Teratocarcinoma stem cells*

VEGF: Factor de Crecimiento endotelial vascular del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

WNT-3: Gen *Wnt Family Member 3*

Agradecimientos:

Al posgrado en Ciencias (Neurobiología) como programa de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que me ha brindado la oportunidad de continuar con mi formación académica.

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

Al personal de la Unidad de Tococirugía y Patología del INPer que me brindaron el apoyo para la obtención del material biológico para este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento otorgado a los proyectos 140917, 130627, 2729668 y A1-S-8450. Así como la beca otorgada durante el programa de posgrado.

A la Dra Maricela Luna coordinadora del programa de posgrado y a la Dra Nuri Aranda quienes me brindaron su apoyo académico.

Agradecimientos especiales

Al Dr. En C. Néstor Fabián Díaz Martínez, quien me permitió ser parte de su equipo de trabajo y depositó su confianza para concluir con este proyecto, además de brindarme las bases para adentrarme en la ciencia y por si fuera poco quien me enseñó a enfretar mis propias batallas.

A las Dras Rocío Brenda Anguiano Serrano y Yazmín Macotela Gúzman, miembros del comité tutorial, quienes me brindaron su apoyo durante mis estudios de posgrado y quienes resultaron ser personas maravillosas y excelentes académicas.

A los miembros del jurado, Dra. Anayansi Molina, Dr. Rodrigo Escartín, Dra. Yazmín Macotela y Dr Adán Hernández por sus acertados comentarios y criticas que fortalecieron este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, quienes en ellos encontré una pequeña familia. la Dra en C. Guadalupe García por brindarme su apoyo incondicional durante todo el proceso, Dra en C. Jessica Romero por su apoyo en las etapas criticas de este trabajo, Dra Daniela Ávila quien otorgó parte de su tiempo y su conocimiento y al M en C Omar Martínez por sus enseñanzas.

A las Dras Rocío Valle y Berenice Marquez quienes por sus aportaciones académicas, consejos, tiempo y paciencia me brindaron mas allá de una amistad.

America, Madai, Nayeli y resto de compañeros del Laboratorio que me acompañaron durante este proyecto.

Con cariño agradezco

A mis padres, Patricia y Daniel quienes me han brindado todo en la vida y que son el motor que me impulsa a seguir adelante.

A mis hermanos, los mejores compañeros de vida Joaquín y Marco Antonio los quiero.

Resumen

Es de interés para la comunidad científica la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de la Diabetes Mellitus (DM) cuyo objetivo sea mantener la normo glicemia, reducir la progresión de las complicaciones agudas y crónicas que con la terapia convencional no se han logrado minimizar. A pesar de que la terapia de trasplante de tejido pancreático ha sido una opción, la baja disponibilidad de donadores, uso de inmunosupresores y los rigurosos criterios de selección para elegir los pacientes candidatos, ha dificultado su uso en la práctica clínica. Es por ello, que dentro del área de la medicina regenerativa, disciplina que tiene por objetivo la obtención *in vitro*, de células, tejidos u órganos a partir de células troncales con un fin terapeutico, se ha propuesto el uso de estas células para derivar tejido pancreático. Bajo la búsqueda de una línea celular que no comprometa la inmunocompatibilidad donador-receptor. Asimismo, que no induzca inflamación, no forme teratomas, no presente aberraciones cromosómicas y no represente problemas éticos-legales. Por lo anterior, se ha sugerido a las células del Epitelio Amniótico Humano (CEAH) provenientes de las membranas fetales, como una promesa en esta área. En el presente trabajo se reporta un protocolo de diferenciación centrado en las vías de señalización del desarrollo embrionario pancreático en cuatro etapas, donde se logró la diferenciación de células precursoras endocrinas capaces de expresar insulina a los 14 días *in vitro*. Este grupo celular expresó marcadores moleculares de diferentes etapas del desarrollo pancreático, así como de hormonas pancreáticas al final del protocolo de diferenciación. Los resultados obtenidos de este trabajo sugieren que las CEAH serían una fuente prometedora para generar células productoras de insulina funcionales las cuales podrían tener aplicaciones en el ámbito clínico dentro del área de la medicina regenerativa, además como modelo fisiopatológico para enfermedades endocrinas pancreáticas o del desarrollo embrionario pancreático.

Abstract

It is of interest to the scientific community to search for new alternatives for the treatment of Diabetes Mellitus (DM) whose objective is to maintain normal glycemia, minimizing the progression of acute and chronic complications independent of exogenous insulin. Although pancreatic tissue transplantation therapy has been an option, the low availability of donors, the use of immunosuppressants, and the rigorous selection criteria for choosing candidate patients, has made its use in clinical practice difficult. That is why, within the area of regenerative medicine, a discipline that aims to obtain in vitro, cells, tissues or organs from stem cells for therapeutic purposes, has proposed the use of these cells to derive pancreatic tissue. Searching for a cell line that does not compromise donor-receptor immunocompatibility. Likewise, that it has anti-inflammatory properties, does not form teratomas, does not present chromosomal aberrations and does not represent ethical-legal problems. Therefore the Human Amniotic Epithelium (CEAH) cells from the fetal membranes have been suggested as a promise in this area. In the present work, a directed differentiation protocol focused on the signaling pathways of pancreatic embryonic development in four stages is reported, where it was possible to obtain endocrine precursor cells capable of expressing insulin at 14 days in in vitro culture. This cell group expressed molecular markers of different stages of pancreatic development as well as of pancreatic hormones at the end of the differentiation protocol. The results obtained from this work suggested that CEAHs can be a promising source to generate functional insulin-producing cells which could have clinical applications within the area of regenerative medicine, as well as a pathophysiological model for pancreatic or developmental endocrine diseases. pancreatic embryonic.

Índice

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Introducción | 11 |
| 2. | Antecedentes | |
| 2.1 | Diabetes Mellitus | |
| 2.1.1 | Concepto y Epidemiología | 12 |
| 2.1.2 | Clasificación | 12 |
| 2.1.3 | Criterios diagnósticos | 13 |
| 2.1.4 | Tratamiento | 14 |
| 2.2 | Las células troncales como alternativa a la terapia de remplazo pancreático | |
| 2.2.1 | Las células troncales, definición | 15 |
| 2.2.2 | Clasificación de acuerdo con su potencial de diferenciación de las células troncales | 15 |
| 2.2.3 | Células troncales pluripotentes | 16 |
| 2.2.4 | Caracterización de las células troncales pluripotentes | 18 |
| 2.3 | Protocolos de diferenciación pancreática | 20 |
| 2.3.1 | Desarrollo embrionario del páncreas y generación de células β | 21 |
| 2.3.2 | Generación de células β a partir de células troncales pluripotentes | 23 |
| 2.4 | Células del epitelio amniótico humano como fuente alterna de células troncales embrionarias humanas | 26 |
| 2.4.1 | Anexos fetales | 26 |
| 2.4.2 | Particularidades de las células del epitelio amniótico humano | 29 |
| 2.4.3 | Origen embrionario de las membranas fetales | 31 |
| 2.4.4 | Caracterización de la pluripotencia en CEAH | 31 |
| 3 | Justificación | 34 |
| 4 | Hipótesis | 35 |
| 5 | Objetivo general | 35 |
| 6 | Objetivos particulares | 35 |
| 7 | Material y métodos | |
| 7.1 | Obtención de muestras de tejido de membranas amnióticas | 36 |
| 7.2 | Extracción, aislamiento y cultivo de CEAH | 36 |
| 7.3 | Protocolo de diferenciación hacia precursores β pancreáticos | 37 |
| 7.4 | Ensayos de inmunocitoquímica | 38 |
| 7.5 | Conteo celular | 39 |
| 7.6 | Ensayos de PCR-punto final | 40 |
| 8 | Resultados | 42 |
| 8.1 | Obtención y caracterización de las CEAH <i>in vitro</i> | 42 |
| 8.2 | Protocolo de diferenciación pancreática a partir de CEAH | 43 |
| 9 | Discusión | 55 |
| 10 | Conclusiones y Perspectivas | 61 |
| 11 | Referencias | 62 |

1. Introducción

La Diabetes Mellitus (DM) es una patología endocrina frecuente en la población mundial y es considerada un problema de Salud Pública por su elevada tasa de incidencia, mortalidad y el gasto público que representa atender esta demanda de salud. La administración de fármacos hipoglucemiantes y la insulina exógena han sido por décadas los tratamientos de elección. Sin embargo, algunos pacientes son refractarios al tratamiento y su uso no exime el desarrollo de complicaciones agudas y crónicas. A pesar de que el trasplante de islotes pancreáticos o incluso del órgano completo ha sido una opción terapéutica, la baja disponibilidad de material biológico, el uso de inmunosupresores y la selectividad de posibles donadores y receptores hace su uso limitado en la práctica clínica rutinaria. De esta forma, en la búsqueda de una alternativa, la terapia celular a base del trasplante de progenitores pancreáticos o células similares a las β secretoras de insulina derivadas a partir de células troncales (CT) pluripotentes ha sido una propuesta por diversos grupos de investigación. No obstante, bajo la premisa de obtener una fuente de dichas células con capacidad de auto renovación y diferenciación, particularmente a células β pancreáticas, de alta disponibilidad, bajo rechazo inmunológico y que no representen un problema ético-legal, se ha propuesto el uso de las células provenientes del epitelio amniótico humano (CEAH). Por ello, en este trabajo se particularizó en la obtención de células productoras de insulina a partir de un protocolo de diferenciación de cuatro etapas que simula el desarrollo embrionario humano pancreático a partir de CEAH capaces de expresar marcadores clave de etapa y resaltando la obtención de marcadores moleculares de la insulina y sus metabolitos intermedios como el péptido C. Los resultados obtenidos no solo harán pensar en el uso de la terapia de remplazo en pacientes diabéticos con este tipo de células, sino además de poder utilizarse como un modelo experimental para explicar fenómenos fisiopatológicos y del desarrollo embrionario del páncreas humano.

2. Antecedentes

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Concepto y Epidemiología

La Diabetes Mellitus (DM) incluye a un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de origen multifactorial, caracterizados por un estado hiperglucémico secundario a la disminución de la producción de insulina o resistencia a la insulina (ADA, 2020). Dicha patología es un problema de Salud Pública a nivel mundial por sus elevadas cifras de incidencia, prevalencia, tasa de mortalidad y el gasto público que representa. En el año 2017, la Federación Internacional de Diabetes, estimó una prevalencia mundial de 425 millones de pacientes diagnosticados, de los cuales 327 millones se encontraban entre los 20 y 64 años. Así mismo, ocupó el décimo lugar de las causas de mortalidad por enfermedades no transmisibles, siendo la responsable del 10.7 % de las defunciones a nivel mundial en personas entre los 20-79 años (Federation, 2017). México, ocupa el quinto lugar a nivel mundial, estimando una tasa de prevalencia de 12.0 millones. Por lo que se refiere a las cifras de defunciones asociadas a complicaciones por diabetes se estimaron 105, 574 muertes, siendo la segunda causa de mortalidad a nivel nacional por enfermedades no transmisibles (15.4%) (ENSANUT, 2016). En cuanto a las cifras del gasto sanitario total se estimó para el año 2017, 19,000 Millones de USD (Federation, 2017).

2.1.2 Clasificación

De acuerdo con su etiopatogenia se puede clasificar en tres grandes grupos: a) DM tipo 1 frecuente en la infancia temprana y la adolescencia, con un componente autoinmune donde existe una lisis selectiva de las células β pancreáticas mediada por linfocitos T activados mediante anticuerpos contra glutamato descarboxilasa GAD, tirosina fosfatasa IA2, insulínicos IAA, entre otros. Así mismo, se ha relacionado con la susceptibilidad genética del antígeno leucocitario humano (HLA) y sus haplotipos de predisposición (HLA DR3-DQA1*0501-DQB1*0201, HLA DR4-DQA1*0301-DQB1*0302) (Mayer-Davis et al., 2018); b) DM tipo 2

causada por la pérdida progresiva de la secreción de insulina aunada a una resistencia de la hormona en órganos periféricos y c) otros tipos de diabetes asociada a otras patologías que incluyen: la diabetes gestacional, síndromes monogénicos de diabetes (entre ellas la diabetes neonatal, MODY por sus siglas en inglés *Maturity-Onset Diabetes Young*), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas (uso de glucocorticoides, fármacos empleados en el tratamiento de VIH/SIDA, inmunosupresores, entre otros) (Federation, 2017; ADA, 2019).

2.1.3. Criterios diagnósticos

La Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés *American Diabetes Association*) describe como criterios diagnósticos la presencia de cualquier de los siguientes valores en diferentes pruebas de laboratorio aunado a ello la presencia de títulos positivos de anticuerpos (para el diagnóstico de DM tipo 1):

- A)** Valores ≥ 126 mg / dL (7.0 mmol / L) de glucosa en plasma en un periodo de ayuno de 8 hrs.
- B)** Valores de 2 h ≥ 200 mg / dL (11.1 mmol / L) durante una prueba de curva de tolerancia a la glucosa, utilizando una carga que contenga el equivalente de 75 g de glucosa anhidrica disuelta en agua.
- C)** Valores de ≥ 6.5 % (48 mmol/ dl) en la prueba de hemoglobina glucosilada.
- D)** En un paciente con síntomas sugestivos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso), más una glucosa en plasma aleatoria ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

2.1.4 Tratamiento

Pese a la amplia farmacopea que se utiliza en la actualidad, la cual incluye a los fármacos hipoglucemiantes como las sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores del transportador de sodio-glucosa o de la dipeptidil peptidasa-4, por mencionar solo algunos, no todos los pacientes responden de forma satisfactoria. Algunas de las complicaciones que se han reportado son las dosis altas y la resistencia o efectos adversos. Por otra parte, la terapia de insulina exógena, desde su descubrimiento y uso en 1922 (Banting F. y Best C., 1922), ha sido utilizada con el objetivo de normalizar los niveles de glucosa, reducir la presencia de signos y síntomas, retardar y mitigar la aparición de complicaciones agudas y crónicas. A pesar de obtener resultados satisfactorios en algunos pacientes, no los exime del desarrollo de complicaciones agudas (síndrome de estado hiperosmolar y la cetoacidosis) y crónicas (micro y macro angiopatías) que pueden atentar su estado de salud (Shahjalal, 2018). De esta manera, el desarrollo de una terapia de reemplazo del tejido pancreático sigue siendo una alternativa para aquellos pacientes refractarios al régimen tradicional. Asimismo, brinda la posibilidad de un tratamiento independiente de insulina pero la baja disponibilidad de tejido donante, el uso de inmunosupresores de por vida para evitar el rechazo del injerto y/o la recurrencia de la destrucción autoinmune de los islotes y las características clínicas que deben poseer los pacientes dificulta esta alternativa terapéutica (Shapiro et al., 2006 ; Shapiro, 2011). Bajo las dificultades previamente descritas, dentro del área de la medicina regenerativa, se ha propuesto el trasplante de progenitores pancreáticos o células secretoras de insulina derivadas a partir de CT como una alternativa terapéutica (Shahjalal et al., 2018).

2.2 Las células troncales como alternativa a la terapia de remplazo pancreático

2.2.1. Las células troncales, definición

Las CT son un grupo particular de células que pueden encontrarse durante el desarrollo del embrión y en la vida adulta, estas poseen dos características importantes, por un lado, la capacidad de autorrenovación, es decir, generar un tipo celular idéntico a su progenitor y su habilidad de diferenciación a por lo menos un tipo celular especializado funcional (Thomson et al, 1998).

2.2.2. Clasificación de acuerdo con su potencial de diferenciación de las células troncales

Existe una amplia familia de CT y pueden clasificarse de acuerdo a su potencial de diferenciación en: a) CT totipotentes, con capacidad de generar a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales de un organismo incluyendo los anexos fetales. Pueden aislarse durante la formación del cigoto, pero tras ocurrir la etapa de formación de la mórula esta característica se pierde; b) CT pluripotentes, las cuales tienen la habilidad de dar origen a linajes celulares provenientes del ectodermo, endodermo y mesodermo, como es el caso de las CT embrionarias o las CT pluripotentes inducidas (iPSC, induced pluripotent stem cells, por sus siglas en inglés); c) CT multipotentes que pueden dar lugar a tipos celulares dentro de un mismo linaje durante el desarrollo embrionario e incluso en tejidos adultos, ejemplo son las CT neurales (Jaenisch et al, 2008) y finalmente tenemos a las CT unipotentes con un potencial de desarrollo más limitado que dan lugar a solo un tipo celular especializado como las células del epitelio intestinal (veáse Figura 1) (Slack et al, 2000; Shevde et al, 2012). En este trabajo nos enfocaremos en las CT pluripotentes, por las razones descritas más adelante.

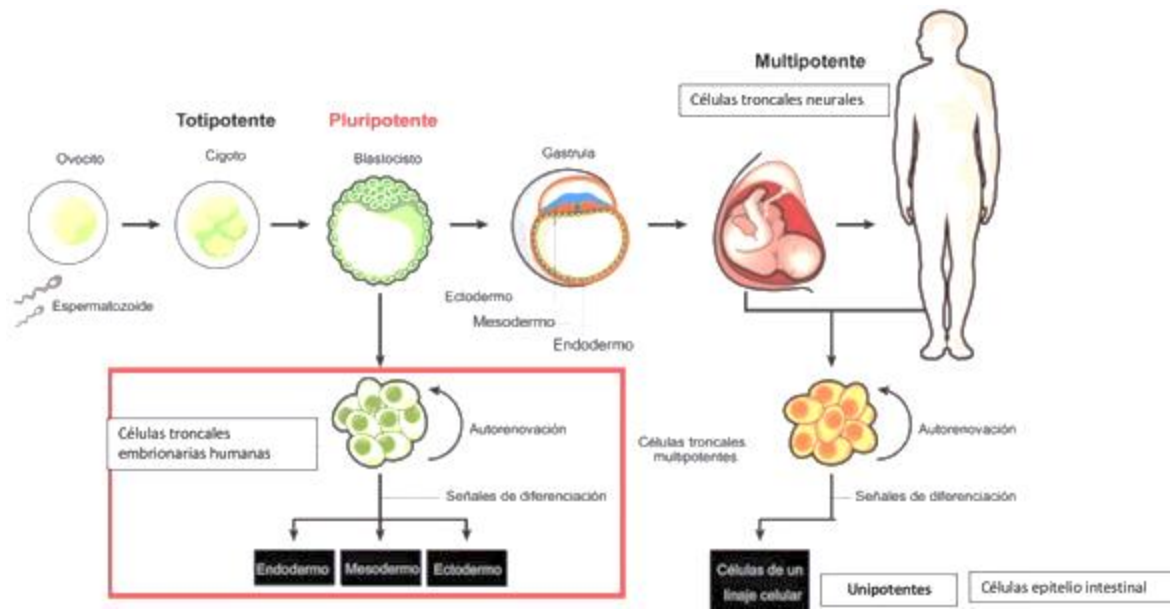


Figura 1. Clasificación de las CT a partir de su potencial de diferenciación durante el desarrollo humano. De acuerdo a su potencial de desarrollo las células troncales se clasifican como totipotentes; localizadas en el cigoto hasta la etapa de 4 células, pluripotentes; originadas de la masa celular interna del blastocisto, ejemplo de ellas son las células troncales embrionarias humanas con capacidad de diferenciación a tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo, multipotentes; ejemplo de ellas son las células troncales neurales que dan origen a neuronas y células de la glía que comparten el mismo origen embrionario y unipotentes; como las células del epitelio intestinal encargadas de la renovación de *novus* (Modificado de Shevde et al., 2012).

2.2.3. Células troncales pluripotentes

Por su potencial de desarrollo y su amplia capacidad de autorenovación, las CT pluripotentes desde su derivación han llamado la atención en el campo de la investigación, ya sea como modelos estudio en la Biología del Desarrollo o como una promesa en el área de la medicina regenerativa y en particular en la terapia de la DM.

La historia de las CT pluripotentes inicia con los trabajos realizados durante los años cincuenta con el estudio de las células provenientes de los teratocarcinomas (tumores originados en las gónadas de ratones endogámicos), las cuales al mantenerse en condiciones *in vitro* podrían dar lugar a las líneas denominadas CT del teratocarcinoma (TSC, por sus siglas en inglés *Teratocarcinoma Stem Cells*) con la capacidad de producir derivados de las tres capas germinales (Stevens et al., 1954, Evans et al., 1972). Investigaciones posteriores demostraron

que al trasplantar embriones en etapas tempranas del desarrollo en los testículos (ratones de la cepa 129), podrían dar lugar a teratomas (neoplasias que presentan tejidos diferenciados de las tres capas germinales), mientras que si se injertaba los teratocarcinomas en dicho sitio se producía la muerte del ratón post-transplante. De este modo, se inició la búsqueda de poder obtener una línea derivada directamente del embrión *in vitro* que conservará todas sus características *in vivo*. No fue hasta los años ochenta cuando se aislaron por primera vez líneas de células pluripotentes originadas a partir de blastocitos de ratones, manteniendo su estado indiferenciado y su potencial de diferenciación en cultivos *in vitro* mantenidos sobre una capa nodriza de fibroblastos de ratón y que al ser inyectadas en el blastocisto de ratón eran capaces de producir organismos quiméricos vivos las cuales posteriormente fueron denominadas como CT embrionarias (Evans et al, 1981; Martin et al, 1981).

En 1995 Thomson y colaboradores generaron CT embrionarias obtenidas de primates no humanos (monos Rhesus) (Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1996), hallazgos que cimentaron las bases para la obtención de cinco líneas celulares humanas pluripotentes, a partir de embriones humanos de menos de una semana post-fecundación, los cuales fueron donados por parejas que fueron sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Thomson et al., 1998).

Por otro lado, tras los estudios pioneros de transferencia nuclear de célula somática a partir de células intestinales de rana en 1962, Gurdon y colaboradores brindaron las primeras bases sobre la reprogramación celular, es decir, llevar a una célula somática altamente especializada a un estado más primitivo durante el desarrollo, manifestando que el proceso de diferenciación celular no es unidireccional como se pensaba anteriormente, sino que una célula altamente diferenciada podría revertir su maquinaria intracelular para convertirse en una célula pluripotente (Gurdon, 1962).

En el año 2006, a través de los trabajos de Takahashi Kazutoshi y Sinya Yamanaka demostraron que era posible la reprogramación celular, a partir de la transferencia de OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC, genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y proliferación celular

(Takahashi Kazutoshi and Sinya Yamanaka, 2006). De forma sorprendente, demostraron que dichos factores eran lo suficientemente eficaces para revertir el estado somático de fibroblastos embrionarios o provenientes de tejidos adultos hacia células pluripotentes, llamándose iPSC (células pluripotentes inducidas humanas por sus siglas en inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) (Takahashi K y Yamanaka S., 2006). A pesar de que estas células son capaces de expresar marcadores bioquímicos y moleculares como se mencionará a continuación involucrados en la caracterización de CT y que han logrado generar teratomas y quimeras después de ser inyectadas en blastómeras de ratón, se ha reportado la existencia de alteraciones genéticas y conservación de marcas epigenéticas de su estado somático que han conllevado a mutaciones, muerte celular o senescencia que podría afectar su funcionalidad y su probable uso en la clínica en comparación al uso de CT embrionarias (Hu et al., 2010, Feng et al., 2010, Zhang et al., 2010).

Como se puede apreciar, debido a sus características ya mencionadas, las CT pluripotentes han desencadenado una revolución en cuanto a sus posibles aplicaciones en el ámbito de la medicina y como un modelo de estudio fundamental en la Biología del Desarrollo.

2.2.4 Caracterización de las células troncales pluripotentes

Las CT pluripotentes poseen una alta capacidad de diferenciación y autorenovación. Sin embargo, debido a que esta familia de células no presenta características citológicas propias, se deben determinar propiedades bioquímicas y moleculares específicas para poder caracterizarlas, entre las cuales podemos mencionar a los antígenos de superficie de naturaleza esfingolipídica o proteoglicánica como SSEA-3 y SSEA4 (por sus siglas en inglés *Stage Specific Embryonic Antigen 3 y 4*, respectivamente), así como TRA 1-60 (por sus siglas en inglés *Tumor Rejection Antigen 1-60*) (Marti et al, 2013). Así mismo, se ha descrito ampliamente que expresan los factores de transcripción POU5F1 (también denominado como OCT4), SOX 2 y NANOG (conocidos como la tríada de la pluripotencia) involucrados en el mantenimiento de esta propiedad a través de la represión de genes que favorecen la diferenciación y la activación de

genes pluripotentes por un mecanismo de autorregulación en el ratón (Cahan et al, 2013; Marti et al, 2013). Otra prueba que contribuye a su caracterización *in vitro* es la de ser positivas a la enzima fosfatasa alcalina tejido inespecífico que es utilizada como un indicador del estado indiferenciado, aunque su mecanismo en este tipo de células no se ha dilucidado completamente (O'Connor et al, 2008). No obstante, las pruebas más rigurosas que demuestran la capacidad de pluripotencia son precisamente las que retan su capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*. De las primeras las podemos dividir en: a) diferenciación directa, la cual consiste en formar cuerpos embrionarios (EB por sus siglas en inglés *Embryoid Bodies*) definidos como agregados celulares que se auto organizan al ser cultivados en suspensión por varios días y capaces de diferenciarse a células de las tres capas germinales y b) diferenciación dirigida, en donde de forma somera se adiciona un cóctel de moléculas de señalización con medios de cultivo específicos a través de diferentes etapas para obtener un tipo celular especializado (véase más adelante). Cabe mencionar que estas últimas son pruebas más estrictas que permiten determinar si las células son pluripotentes. De esta manera, se han descrito a la formación de teratomas (tumores que se desarrollan al trasplantar células troncales pluripotentes indiferenciadas en ratones inmunosuprimidos y alrededor de 30 días post-trasplante son capaces de generar células diferenciadas derivadas de las tres capas germinales) y la formación de quimeras con transmisión a la línea germinal reservadas solo para la investigación con modelos animales debido a situaciones éticas y legales (Wu et al, 2015; Buta et al, 2013).

Asimismo, tras el avance de la investigación genómica se han determinado bases de datos que recopilan análisis bioinformáticos basados en la comparación de perfiles de expresión génica de CT y somáticas, uno de ellos es el Pluri-test desarrollado por el laboratorio Loring que permite la verificación rápida, eficiente y rentable de la pluripotencia, comparando el perfil transcripcional de una muestra o una línea celular presuntamente pluripotente con más de 450 firmas genéticas de células pluripotente y no pluripotentes previamente caracterizados, donde se incluyen 223 hESC, 41 hiPSC, células somáticas y tejido, pero su uso se ve limitado por su

uso exclusivo sobre la plataforma de Illumina HT12v3 y v4 (Muller et al., 2011). Como una alternativa, el Epi-Pluri-Score permite discernir entre células pluripotentes y somáticas basándose en biomarcadores epigenéticos como el estado de metilación del DNA en tres sitios CpG. La combinación de metilación del DNA en genes C14ORF115 y ANKRD46 (por sus siglas en inglés *Ankyrin Repeat Domain 46*) y bajos en OCT4 podría clasificar a la célula analizada como pluripotente comparándola a su vez con 264 muestras de líneas pluripotentes y 1951 líneas somáticas con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99.9% de esta prueba (Lenz et al., 2015).

2.3 Protocolos de diferenciación pancreática

Como se mencionó previamente, una de las pruebas para determinar el potencial de diferenciación celular en un grupo de células pluripotentes es someter a este grupo celular a diferentes cocteles de moléculas que irán orquestando el proceso de diferenciación celular en condiciones de cultivo muy específicas. Bajo estos argumentos y como una fuente de células productoras de insulina, diversos grupos de investigación han podido desarrollar protocolos de diferenciación pancreática a partir de este tipo celular, los cuales conforme avanza nuestro conocimiento cada vez se hacen más complejos y eficaces, teniendo más éxito aquellos que imitan el desarrollo embrionario pancreático, mediante el uso de moléculas que permiten dirigir a las células a etapas específicas embrionarias las cuales han sido trasplantadas en modelos de ratones inmunosuprimidos y son capaces de revertir el estado hiperglucémico (Kroon et al., 2008; Rezania et al., 2014; Velazco-Cruz et al., 2019; Cota-Coronado et al., 2019) (veáse Tabla 1).

Para comprender el objetivo de los protocolos de diferenciación pancreática que imitan el desarrollo embrionario a continuación se describe este proceso

2.3.1. Desarrollo embrionario del páncreas y generación de células β pancreáticas

El páncreas se compone de dos tipos de tejidos, el tejido pancreático exocrino y el endocrino, este último conformado por islotes que representa menos del 5 % de la masa celular de dicho órgano, en donde se han descrito cinco poblaciones celulares con capacidad de secreción endocrina. Cada una de ellas sintetiza y secreta una hormona principal: insulina (células β), glucagón (células α), somatostatina (células δ), polipéptido pancreático (células PP) y ghrelina (células ϵ) (Zhou et al., 2018).

Dicho órgano posee un origen embriológico endodérmico. A pesar de las dificultades para obtener dicho tejido en etapas tempranas del desarrollo en el humano y de contar con modelos animales como el ratón y el pollo que tratan de simular las condiciones *in vivo*, los datos que nos proporcionan son extrapolados a nuestra especie. No obstante, la información recabada es limitada (veáse Figura 2).

De esta forma, se ha descrito que el páncreas se deriva del endodermo definitivo de donde emergen dos brotes o yemas, uno en la región dorsal y otro ventral. Posteriormente, gracias al silenciamiento de la señal de SHH (Sonic-Hedgehog) por el contacto directo de la notocorda con el endodermo dorsal donde se secreta un miembro de la familia del TGF- β (Factor de crecimiento transformante β) conocido como FGF2 y Activina B2 se forma el brote dorsal, esta interacción que existe entre la notocorda y el endodermo termina al fusionarse la aorta dorsal (Slack J. M. (1995). McCracken et al, 2012 Al-Khawaga, et al, 2017). Por otro lado, la formación del brote ventral esta originada por la interacción entre las venas vitelinas y el endodermo ventral. Las células en esta etapa son capaces de expresar factores de transcripción como Brachyury (BRA), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4 por sus siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor 4*), Wnt-3, factor de transcripción de caja SRY17 (SOX-17) y Forkhead box A2 (FOXA2) alrededor de los 22 a 26 días de vida intrauterina en el humano (Gites G. et al, 2009, McCracken et al, 2012, Al-Khawaga, et al, 2017). Mediante la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) comienza la formación del tubo del intestino primitivo

durante los 25-27 días subsecuentes con lo cual emerge una población que expresa al factor nuclear 4 alfa de hepatocito (HNF1B), factor nuclear de hepatocito 4A (HNF4A), FOXA2, el gen homeótico de caja pancreático y duodenal 1 (PDX-1), este último permanece durante las subsecuentes etapas del desarrollo y se denomina como específico de páncreas en mamíferos. De la región posterior del tubo digestivo anterior alrededor de los 27-29 días, existe un peculiar grupo de células capaces de expresar PDX-1, FOXA2, GATA4, SOX9 y HNF6 que darán origen a las siguientes líneas celulares ductales y a los progenitores pancreáticos durante los siguientes 29 a 33 días (Slack J. M. (1995). Pan. F et al, 2014, McCracken et al, 2012). Este progenitor troncal positivo a PDX1, FOXA2, GATA4, GATA6, SOX9 y NKX6.1 es capaz de dar origen a dos tipos celulares denominados progenitores endocrinos (PDX1, FOXA2, SOX9 y NKX6.1) y las células acinares (SOX9, FOXA2 y PDX1). Finalmente, los progenitores endocrinos darán origen a los diferentes linajes celulares capaces de liberar hormonas, especialmente a las células β que son las primeras en diferenciarse (PDX1, FOXA2, NKX6.1, NKX2.2, MAFA, MAFB, MNX1 e ISL1) con capacidad de secretar insulina alrededor de los 50 días de vida intrauterina. Seguidas de las células positivas a glucagón, somatostatina, células de polipéptido y ghrelina, respectivamente (Slack J. M. (1995); McCracken et al, 2012).

Una vez comprometidas las células precursoras endocrinas y el resto de los linajes celulares de la región ventral y dorsal del tubo digestivo anterior y posterior surgen dos brotes alrededor de los 26 y 30 días de vida intrauterina. Estas estructuras siguen proliferando hasta llegar la semana 6-7 de vida intrauterina donde se fusionarán las yemas tras una rotación dextrógira formando una "C" situándose posteriormente el brote ventral próximo al brote pancreático dorsal. En el órgano maduro el brote pancreático ventral formará la cabeza del páncreas y el proceso uncinado comunicado con el duodeno a través del conducto de accesorio; mientras que del brote pancreático dorsal surgirá el cuerpo y la cola del páncreas comunicándose a través del conducto pancreático principal. En la etapa adulta el páncreas logra dimensiones de 20 cm de longitud y un peso de 100 gr, logrando una excreción de Insulina de 30 UI (Unidades Internacionales) al día (Zhou et al, 2018).

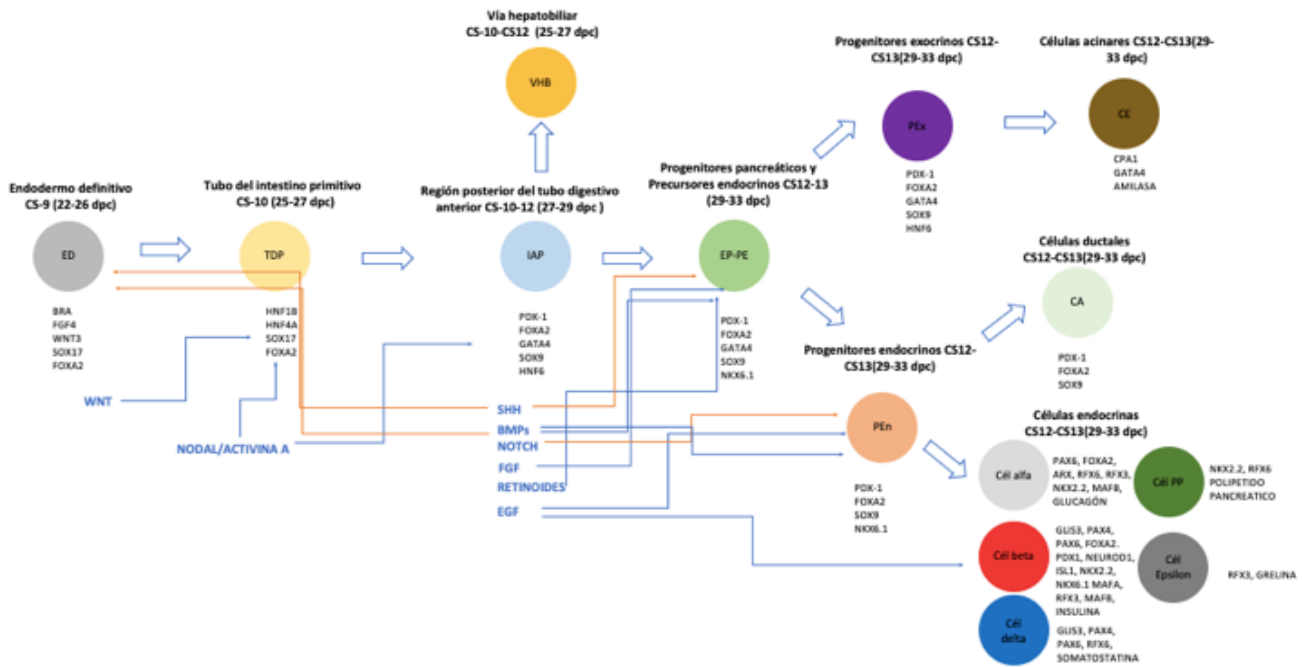


Figura 2. Desarrollo pancreático y vías que gobiernan su proceso de diferenciación. Esquema que ilustra la vía de desarrollo embrionario del páncreas, partiendo desde el ED alrededor de los 22-26 dpc, seguido de la formación del TDP y IAP de los 25-27 a 29 dpc respectivamente. Posterior a la formación de células multipotentes EP-PE entre los 29 a 33 dpc, estos progenitores darán origen a células del tejido exocrino y endocrino. La inducción y diferenciación a cada uno de los tipos celulares particulares se debe al silenciamiento (líneas color rojo) y activación (líneas color azul) de vías de señalización. Se observa en la parte central gran parte de FT y moléculas que expresan cada tipo celular que sirven para su caracterización (véase texto). ED endodermio definitivo, TDP (tubo digestivo primitivo) IAP (región posterior del tubo digestivo anterior), EP-PE (progenitores pancreáticos y precusores endocrinos), PEx Progenitores exocrinos CA células acinares CA células ductales PEn progenitores endocrinos SHH sonic hedgehog BMP, proteína morfogenética ósea NOTCH vía de Notch, FGF factor de crecimiento de Fibroblastos (por sus siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor*) EGF, factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*). Modificado de Al-Khawaga, 2017.

2.3.2. Generación de células β a partir de células troncales pluripotentes

Con base en los antecedentes mencionados, un diverso número de investigadores han podido refinar cada vez más los procesos por los cuales se obtienen células productoras de insulina a partir de células troncales pluripotentes como se había mencionado. Los primeros trabajos realizados por Lumelsky y colaboradores en 2001 lograron dar las bases para la obtención de células capaces de expresar insulina a partir de células troncales embrionarias de ratón

sometidas a un protocolo de diferenciación dirigida de cinco etapas con un medio suplementado con Nicotinamida y ser funcionales al ser estimuladas con diferentes concentraciones de glucosa (Lumelsky et al, 2001). A pesar de estos hallazgos interesantes, este protocolo obtenía diversos grupos celulares de origen endodérmico como células que expresaban glucagón e insulina, y unas más de origen ectodérmico que expresaban TUJ1 y nestina (marcador de CT neurales) debido a que este método fue diseñado para la obtención de neuronas dopaminérgicas y posteriormente fue adaptado para el fin antes descrito. No obstante, la gran debilidad que tuvo este trabajo fue que las células insulina positivas captaban la insulina contenida en el medio de incubación y no era sintetizada *de novo* por la célula. Más tarde, diversos grupos de trabajo trataron de recapitular el origen embrionario del páncreas para obtener una población enriquecida capaz de generar células productoras de insulina mediante la adición de factores de crecimiento y/o inhibidores de señales químicas específicas durante los eventos de diferenciación a partir de líneas de CT embrionarias humanas. Tal es el caso del trabajo reportado por D'Amour y colaboradores en el año 2006 donde a partir de un protocolo de cinco etapas recapitularon el proceso embriológico del páncreas dirigiéndose hacia células endocrinas, especialmente a las células β . En cada una de las etapas se obtenía una población capaz de expresar factores de transcripción involucradas en proceso de desarrollo descritos en el páncreas, las cuales eran funcionales al ser retadas en condiciones *in vitro* (D'Amour et al, 2006). Es por ello, en el año 2007, el mismo grupo de investigadores probaron su protocolo en condiciones *in vivo* al ser trasplantadas en un modelo de ratón inmunodeprimido tratado con estreptozotocina (droga que permite la lisis selectiva de células β pancreáticas) (Kroon et al, 2007). Estos trabajos sentaron las bases para lograr refinar y obtener poblaciones celulares similares a las células del islote humano que en las últimas décadas han sido más refinados como se resume en la Tabla 1 (véase Tabla 1).

A pesar de obtener resultados satisfactorios con el uso de células embrionarias humanas, estas presentan desventajas si se desea llegar a su uso en la Medicina Regenerativa, como la capacidad para formar teratomas cuando se trasplantan en un estado indiferenciado,

inmunocompatibilidad donador-receptor, problemas de aberraciones cromosómicas que sufren este tipo celular en pasajes altos del cultivo celular, existe un número limitado de líneas celulares que no brindarían la demanda a nivel mundial y sin olvidar los problemas ético-legales asociados con la obtención de estas células ya que su derivación conlleva a la hipotética destrucción de embriones humanos (García-López et al., 2015).

| Referencias (Líneas celulares utilizadas) | Condiciones de diferenciación | Tipos celulares inducidas | Porcentaje de células insulina + | GSIS | Transplante | ¿Control hiperglucémico? |
|---|--|---|----------------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
| D'Amour et al. 2006 CyT203 (hESC) | MEFs | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, PPY+, GHRL+ INS +, PEP-C + | 7.3 % (3-12%) | No | n.a | nd |
| Shim et al 2006 Miz-hES4- Miz-hES6 (hESC) | Cultivo en suspensión | PDX-1+, HNF1-6+ GCG+, SST+, INS +, PEP-C + | nd | Sí (in vivo) | BALB/c ratón/cápsula renal | Sí |
| Jiang et al 2007 H1 y H9 (hESC) | Matrigel | PDX-1+, HNF1-6+ GCG+, SST+, INS +, PEP-C + | >15% | Sí (in vitro) | BALB/c ratón/cápsula renal | Sí |
| Kroon et al 2008 CyT49, CyT203 (hESC) | Matrigel | PDX-1+, HNF1-6+ GCG+, SST+, PPY+, GHRL+, INS +, PEP-C + | Nd (post-transplante) | Bajo (in vivo) | Ratón SCID-beige/ epididimo | Sí |
| Zhang et al. 2009 H1, H9 (hESC), C1, C2 y C5 (hiPSC) | MEFs | PDX-1+, HNF1-6+ GCG+, SST+ INS +, PEP-C + | 25% | Bajo (in vitro) | n.a | n.d |
| Rezania et al. 2014 H1, ESI-49 (hESC) | Matrigel /cultivo en suspensión agitada | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, PPY+, GHRL+ INS +, PEP-C + | 55-60% (post-transplante) | Sí (in vivo) | Ratón SCID-beige y ratones STZ/tej. Subcutáneo | Sí |
| Pagliuca et al 2014 HUES-8 (hESC), hiPSC-1, hiPSC-2 | Cultivo en suspensión agitada | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, INS +, PEP-C + | > 30% | Sí (in vivo e in vitro) | Ratón SCID-beige y ratón diabético NRG-Akita/cápsula renal | Sí |
| Algulnic et al 2015 CyT49 (hESC) | Cultivo en suspensión | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, INS +, PEP-C + | 40-50 % | Sí (in vivo) | Ratón SCID-beige y ratones STZ/tej. Subcutáneo | Sí |
| Manzar et al. 2017 T1d hiPSC | Matrigel/3D | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, INS +, PEP-C + | >56% | Sí (in vitro) | Ratón SCID-beige y ratones STZ/tej. Subcutáneo | Sí |
| Yabe et al. 2017 TKDN4-M, 2 | Matrigel/ agregados celulares sobre suspensión | PDX-1+, HNF1-6+, NKX6.1, GCG+, SST+, INS +, PEP-C | 30-33% | Sí (in vitro) | Ratón SCID-beige y ratones STZ/cápsula renal | Sí |

Tabla 1. Protocolos de diferenciación dirigida hacia células productoras de insulina a partir de hESC y hiPSC. Se describen diversos trabajos que recapitulan procesos del desarrollo pancreático humano sobre diferentes condiciones de cultivo *in vitro*, hasta la generación de células productoras de insulina en distintos porcentajes, así como sus propiedades para liberar insulina al medio *in vitro* al ser estimuladas con glucosa y su capacidad para controlar un estado hiperglucémico en modelos murinos al ser transplantadas. hESC (células troncales embrionarias humanas, por sus siglas en inglés human embryonic stem cells), hiPSC células troncales pluripotentes inducidas humanas, por sus siglas en inglés human induced pluripotent stem cells), GSIS prueba de estimulación de insulina con glucosa por sus siglas en inglés Glucosa stimulation Insulin.

2.4 Células del epitelio amniótico humano como fuente alterna de células troncales embrionarias humanas

Por las desventajas descritas anteriormente, diversos grupos de investigación a nivel mundial han optado por buscar fuentes alternativas de CT pluripotentes como podrían ser las células derivadas de los anexos fetales, tales como el cordón umbilical, placenta y de las membranas fetales humanas (veáse Figura 3) (Evangelista M, et al,2008). A continuación, describiremos las características de estos tejidos embrionarios.

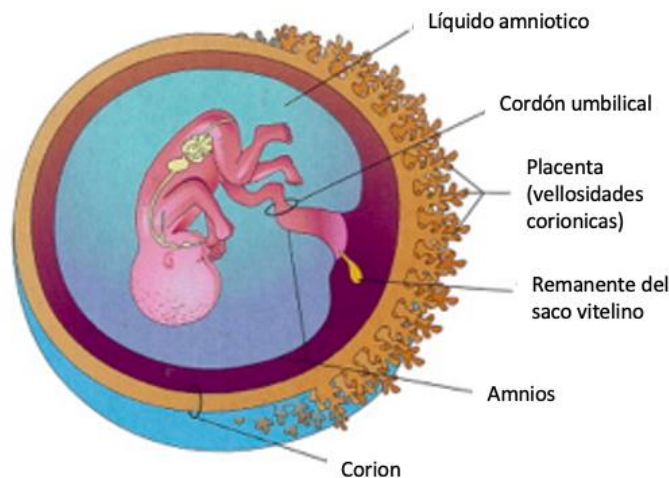


Figura 3. Anexos fetales. Los anexos fetales están constituidos por la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales (amnios y corion) estructuras anatómicas donde se han descrito posibles fuentes alterna de células troncales. Modificado de Ilancheran et al., 2009.

2.4.1. Anexos fetales

Los anexos fetales están constituidos por tres estructuras: 1) la placenta, 2) el cordón umbilical y 3) las membranas fetales (integradas por el corion y el amnios). Cada una de las estructuras antes mencionadas presentan características morfológicas y funcionales distintas. La placenta, al final del periodo de gestación, posee una forma discoidea de 15-20 cm de diámetro y 2-3 cm de grosor de la cual se extienden las membranas fetales, permitiendo el intercambio con el medio externo, regular la actividad renal, hepática y pulmonar principalmente (Benirschke et al, 2000). El cordón umbilical, es una estructura que se extiende desde el ombligo del feto hasta la superficie fetal de la placenta, tiene un diámetro de 0.8 a 2.0 cm y una longitud promedio de 55

cm, en su interior contiene tres vasos sanguíneos, dos arterias y una vena rodeados por la matriz extracelular constituida por un tejido conjuntivo especializado, llamado "Gelatina de Wharton" (Benirschke et al, 2000).

Por su parte, las membranas fetales constituyen una capa que proporciona protección y estabilidad homeostática del medio interno y externo durante el desarrollo del ser humano, las cuales están conformadas por: a) el corion, que corresponde a la membrana fetal más externa, relacionada con la cavidad uterina, dividida en dos regiones; mesodérmica y trofoblástica, que en su mayoría está integrada por una capa fibrosa donde circulan los vasos sanguíneos; y b) el amnios, una membrana interna próxima al líquido amniótico que carece de fibras musculares, cuya función es brindar protección durante la gestación por su alta fuerza tensil y flexibilidad (Malak et al., 1993).

Anatómicamente se describen tres regiones del amnios; la umbilical cercana al cordón umbilical, el amnios de la parte refleja que abarca la porción libre que envuelve al feto y el amnios de la parte placentaria en relación directa con la placenta (véase Figura 4). Si bien el amnios se describe como una estructura única y continua, estudios recientes muestran que las células de estas subregiones difieren de manera significativa en sus propiedades morfológicas, estructurales, transcriptómicas, funcionales y en su capacidad de diferenciación hacia un linaje celular especializado (Weidinger A et al., 2021). Morfológicamente la región de la parte refleja se describe como una sola membrana con células de apariencia cuboidal con núcleos centrales, mientras que las de la parte placentaria son cilíndricas con núcleos apicales descentralizados (van Herendael et al., 1978; Han et al., 2008, Yoon et al., 2014). El amnios umbilical por su parte, posee tres o cuatro capas epiteliales con células que presentan un halo perinuclear en las capas más internas y núcleos picnicos o ausentes en las externas (van Herendael et al., 1978; Han et al., 2008, Yoon et al., 2014; Weidinger A et al., 2021). Funcionalmente, el amnios de la región refleja expresa mayormente factor de crecimiento transformante β 1, 2 3 (TGF β 1 / TGF β 2 / TGF β 3) y su receptor, además de HLA-G que fomenta la respuesta de las células Th2, en comparación con las otras subregiones, lo que podría sugerir una capacidad

inmunomoduladora más desarrollada. Por su parte, el amnios de la región placentaria promueve un estado proinflamatorio por la expresión de quimiocina 6, prostaglandina-endopéroxido sintasa 2 o ciclooxigenasa 2, IL6-6, MAPK1/3 e IL-1b, mayor capacidad de proliferación y diferenciación por su actividad mitocondrial significativamente superior a otras regiones y su amplia capacidad de dar origen a células de origen mesodérmico (Weidinger A et al., 2021). No obstante, estudios en el laboratorio no han encontrado diferencias en marcadores de pluripotencia entre dichas regiones (García-López et al. 2019).

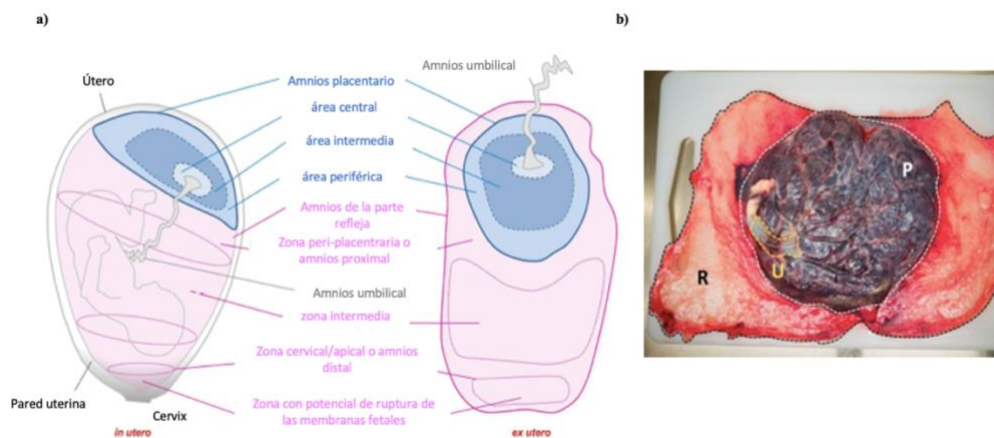


Figura 4 Regiones anatómicas del amnios. **a)** El amnios humano puede dividirse anatómicamente en tres regiones: la región placentaria en relación con la placenta, la región refractaria, la parte libre que envuelve al feto y la región umbilical, proxima al cordón umbilical **b)** Imagen *ex útero* en donde se aprecian dichas regiones umbilical (U amarillo), placentaria (P blanco) y refractaria (R negro) (Modificado de Weidinger A et al., 2021 y Avila González et al. 2019).

El amnios está histológicamente conformado por cinco diferentes capas: 1) capa epitelial: compuesta por un epitelio simple, de células cilíndricas con un núcleo grande y citoplasma abundante con presencia de vacuolas, 2) membrana basal, conformada por fibras de colágeno tipo III, IV y V, fibronectina y laminina, cuenta con un grosor de 30-30 mm entre la capa epitelial y su membrana basal; 3) capa compacta, formada por colágeno tipo I, II, V, y VI y fibronectina; 4) capa fibroblástica, se encuentran células mesenquimales y macrófagos, así como colágeno

tipo I, III, VI y Laminina y 5) capa esponjosa o intermedia, compuesta por colágeno tipo I, III, IV y proteoglicanos (véase Figura 5) (Mamede et al, 2012 Miki T, et al, 2005, García-Lopez et al., 2015).

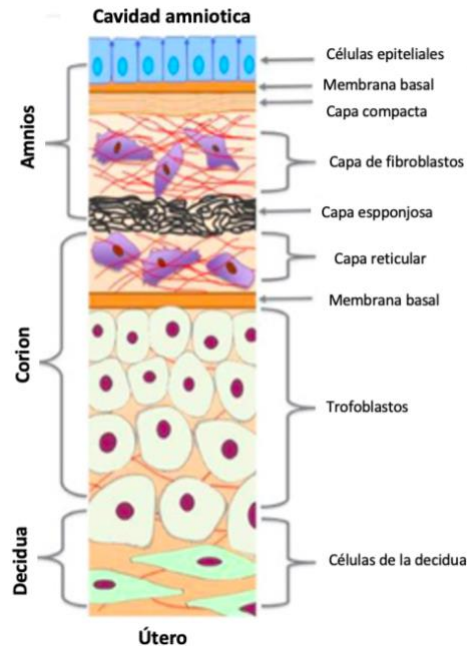


Figura 5. Histología de las membranas fetales. Se observan las capas histológicas que componen las membranas fetales: a) el amnios: membrana próxima al feto constituida por la capa epitelial, membrana basal, capa compacta, capa de fibroblasto, capa esponjosa, adosada a ella el b) el corion: constituida por una capa reticular, una membrana basal y una capa constituida por trofoblastos. c) finalmente se observa la decidua de la pacenta que se adosa al endometrio del útero (Ilancheran et al., 2009).

2.4.2. Particularidades de las células del epitelio amniótico humano

De forma interesante, las CEAH no sólo brindan protección mecánica durante la gestación sino además se le han atribuido propiedades anti-inflamatorias, anti-bacterianas, anti-virales y su casi inexistente inmunogenicidad. Por lo que se refiere a las primeras se deben a la expresión de antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1), IL-2 e IL-10 y endostatina, la cual inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Hao Y. et al., 2000). La IL-1 β es otra molécula producida por las células epiteliales amnióticas y está involucrada en la regulación de la producción de prostaglandinas durante la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2000). Asimismo, el amnios

permanece como un microambiente inerte gracias a sus propiedades antimicrobianas y antivirales, debido a la expresión de varias moléculas entre ellas la Nistatina E, análogo del inhibidor de proteasas de cisteína con propiedades anti-virales (Ni et al., 1997), las β -defensinas, especialmente β -defensina 3, que inician la respuesta inmune innata (Buhimschi et al., 2004; Hao Y et al., 2000; King et al., 2007). Finalmente, las CEAH no expresan el MHC- II y de manera consecutiva el MHC-G lo que les confiere una tolerancia inmunitaria durante el embarazo (véase Figura 6).



Figura 6. Propiedades de las CEAH. El epitelio amniótico humano es un tejido con amplias propiedades entre las que destacan las inmunológicas, su uso en la clínica para el tratamiento de diversas patologías, no representan un problema ético-legal su obtención, así como su uso en la medicina, y su capacidad de diferenciación a un tipo celular especializado derivado de las tres capas germinales. Modificado de Zhand et al 2020.

2.4.3 Origen embrionario de las CEAH

De forma sorprendente, las CEAH comparte el mismo origen embrionario que las CT embrionarias humanas, específicamente del epiblasto. Inicialmente, en la ausencia de evidencia experimental, el origen del amnios era deducido mediante observaciones histológicas de cortes obtenidos de embriones de primates no humanos. De esta forma, alrededor del día embrionario 8-9 (etapa de Carnegie 5a y 5b) se inicia la amniogénesis en el embrión humano y en la etapa 5c (10-11 días postfertilización) ya era evidente la formación de la cavidad amniótica (Hertig, et al., 1956). De forma similar, en el macaco, la cavidad amniótica aparecía al día embrionario 10 y al día siguiente se encontraba completamente formada (Enders AC et al., 1986).

En 2016 dos grupos de investigación de manera independiente reportaron por primera vez *in vitro* de embriones humanos para estudiar su desarrollo post implantación. Ellos reportaron al 9-10 día que un subgrupo de células del epiblasto adquieren una polarización apical-basal y se organizaban de forma radial formando un lumen el cual correspondía a la cavidad amniótica (Deglincerti A. et al., 2016; Shahbazi et al., 2016). Así mismo, se demostró que las CEAH derivan del epiblasto mediante un modelo 3D de CT pluripotentes. De esta forma, las células al crecer en un sistema biosintético que simulaba el nicho de la implantación formaban una estructura parecida a un quiste constituida por un epitelio columnar (epiblasto) y células escamosas (amnios) (Shao Y. et al., 2017; Zheng et al., 2019).

2.4.4 Caracterización de la pluripotencia en CEAH

En las últimas décadas se ha documentado que las CEAH expresan varios marcadores bioquímicos y moleculares involucrados en la pluripotencia, entre los que figuran los antígenos embrionarios de etapa-específicos SSEA-3 y -4, TRA-1-60 y TRA-1-81, factores de transcripción *POU5F1* también llamado *OCT-4*, *SOX2* y *NANOG*, los cuales han sido reportados mediante diversas técnicas como son RT-PCR, inmunocitoquímica, western blot, RNA seq, entre otras (Miki T et al 2005; Ilancheran et al, 2007; García-López et al, 2015, García-Castro et al, 2015, García-López et al, 2019).

Asimismo, para probar su potencial de diferenciación *in vivo*, estudios pioneros por Tamagawa y colaboradores en 2004 empleando agregados quiméricos de células troncales embrionarias de ratón y de células del amnios, encontraron que estas eran capaces de diferenciarse hacia células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas (Tamagawa T et al, 2004).

Debido a estas particularidades, diversos laboratorios alrededor del mundo, se han dado a la tarea mediante numerosos protocolos de diferenciación involucrando a las células del amnios para obtenerse tejidos de diferente índole como lo son neuronas productoras de acetilcolina, catecolaminas, hepatocitos, tejido óseo, cardiomiocitos, entre otros (Elwan y Sakuragawa, 1997; Kakishita et al., 2003; Serra M, et al, 2018, Zhou Y et al, 2011, Han X et al, 2011).

De manera notable, en la literatura se han reportado diversos protocolos de diferenciación a partir de CEAH hacia células productoras de insulina mediante la inducción con Nicotinamida como el reportado por Wei et al., 2003, en donde demostraron su capacidad funcional en un modelo de ratón diabético (Wei et al, 2003). De igual forma, Hou y colaboradores lograron obtener células positivas a insulina al ser trasplantadas a un modelo murino de hiperglucemia alcanzando un estado normo glucémico (Hou et al, 2008). A pesar de que se han obtenido células productoras de insulina con protocolos que no simulan el desarrollo *in vivo* pancreático (veáse Tabla 2), no se equiparan a aquellos protocolos que sí lo realizan, ya que en estos últimos se logran determinar poblaciones específicas endodérmicas como las de Insulina, así como la obtención de un porcentaje mayor de células con capacidad funcional. Es por ello, que en este trabajo se retaron a las CEAH con un protocolo de diferenciación dirigida (Schulz T, et al, 2012) y se determinarán diversos marcadores moleculares de diferentes etapas que recapitulan etapas del desarrollo pancreático antes mencionado.

| Protocolo de diferenciación | Condiciones de diferenciación | Tipos celulares utilizadas | Tipos celulares obtenidos /Porcentaje de células insulina + | GSIS | Transplante | ¿Control hiperglucémico? |
|-----------------------------|---|----------------------------|---|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Miki et al. 2005 | Nicotinamida por 14 días | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR INS +: ND | ND | ND | ND |
| Wei et al 2004 | N2 suplementado, 10 nM + Nicotinamida por 2-4 semanas | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR INS +: ND | Sí (<i>in vitro</i>) | Ratón CD1/cápsula renal | Sí |
| Hou et al 2008 | N2 suplementado + 10 nM nicotinamida por 2-4 semanas | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR INS +: ND | Sí (<i>in vitro</i>) | Ratón tx Estreptomina | Sí (hipoglucemia) |
| Szukiewicz et al 2009 | 10 nM Nicotinamida | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR INS +: ND | ND | Ratón tx Estreptomina | Sí |
| Okere et al 2009 | 100 ng/mL Activina A por 4 días en SFM, 100 ng/ml, Activina A y 10 nM Nicotinamida por 4 días, 10 nM Nicotinamida y 2 uM ácido retinoico por 10 días. | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR | Sí (<i>in vitro</i>) | ND | ND |
| Zou et al 2014 | DMEM libre de suero, suplemento de N2, nicotinamida por dos semanas | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR/ INS + 43 % (citometría de flujo) | Sí (<i>in vitro</i>) | ND | ND |
| Balaji S. et al. 2017 | Nicotinamida, Activina A, transfección de PDX-1 | CEAH | RT-PCR/INS +: ND | ND | ND | ND |
| Luo et al 2019 | Etapa 1: Suplemento B27, Activina A y CHIR99021 por un día, B27 con activina A por 2 días. Etapa2: B27 con dorsomorfina, ácido retinoico, SB431542 por siete días, Etapa 3: B27 B27 fosfocolina, dexametasona, Inhibidor Alk5 II, y Nicotinamida. | CEAH | Inmunofluorescencia/ PCR INS +: ND | Sí (<i>in vitro</i>) | Ratón tx Estreptomina | Sí |

Tabla 2. Protocolos de diferenciación pancreática a partir de CEAH. Se describen protocolos de diferenciación donde se obtienen células productoras de insulina a partir de CEAH a partir de diferentes condiciones de cultivo. ND: no determinado SFM Serum Fetal Medium (medio suplementado con Suero Fetal bovino), GSIS Secreción de Insulina Estimulada por glucosa del inglés Glucose Stimulated Insulin Secretion

3 Justificación

La DM es un problema de Salud Pública a nivel Mundial y Nacional por su elevada prevalencia e índice de mortalidad, así como el gasto público que genera el tratamiento y seguimiento de estos pacientes, es de interés proponer nuevas alternativas de tratamiento cuyo objetivo va dirigido a mantener la normo glicemia, minimizando la progresión de las complicaciones agudas y crónicas. A pesar de que la terapia de trasplante de órgano completo o de islotes pancreáticos ha sido una opción, la baja disponibilidad de donadores cadavéricos, los estrictos criterios en la selección de pacientes candidatos y la terapia inmunosupresora ha dificultado su uso en la práctica clínica. Es por ello que se ha postulado una alternativa innovadora sustentable y sostenible a partir de CT embrionarias humanas cuyas propiedades de auto-renovación y diferenciación hacia cualquier tipo especializado de las tres capas embrionarias las hacen un candidato ideal para la Medicina Regenerativa. No obstante, debido a las limitaciones éticas-legales, así como su potencial para desarrollar neoplasias ha dificultado su aproximación en la clínica. Como medida a las desventajas descritas anteriormente se ha propuesto el uso de las CT obtenidas a partir de los anexos fetales como las CEAH que más allá de presentar marcadores de células pluripotentes y compartir el mismo origen embrionario que las CT embrionarias, brindan propiedades anti-inflamatorias, anti-antigénicas, anti-bacteriales, antivirales y baja o nula respuesta al rechazo inmunológico lo que las hacen una atractiva alternativa (García-López et al., 2015). Es por ello que en este estudio se pretendió obtener células productoras de insulina a partir de CEAH mediante un protocolo de diferenciación pancreática que simuló las condiciones *in vivo*, lo que en un futuro brindaría una fuente cuasi ilimitada, de fácil acceso, sin limitaciones éticas y legales.

4 Hipótesis

Las células EAH que se derivan del epiblasto, tras someterse a un protocolo de diferenciación dirigida de cuatro etapas que simula el desarrollo embrionario pancreático, serán capaces de diferenciarse a células positivas a insulina.

5 Objetivo general

Derivar células positivas a insulina capaces de expresar marcadores moleculares de diferentes etapas del desarrollo pancreático humano a partir de CEAH.

6 Objetivos específicos

1. Obtener CEAH a partir de los anexos fetales.
2. Caracterizar mediante marcadores moleculares de pluripotencia a las CEAH.
3. Determinar la capacidad de diferenciación de las CEAH hacia células positivas a insulina.

7 Material y Métodos

7.1 Obtención de muestras de tejido de membranas amnióticas

La obtención de las membranas amnióticas se llevó a cabo en la Unidad de Tococirugía del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Instituto Nacional de Perinatología. Bajo previa firma del Consentimiento Informado, se seleccionaron las membranas fetales de mujeres con edades gestacionales entre 37-40 semanas, que cursaron con un embarazo normo evolutivo, sin evidencia de trabajo de parto activo, sin antecedentes o características clínicas y/o microbiológicas de infección, sometidas a cesáreas electivas. Cabe mencionar que este protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología con número de registro INPer-2018-1-150.

7.2 Extracción, aislamiento y cultivo de las CEAH

Las membranas amnióticas fueron transferidas de la unidad de Tococirugía del Instituto al laboratorio en solución salina al 0.9%, en donde fueron manejadas bajo estrictas condiciones de esterilidad. Para el aislamiento de las células se siguió como referencia el protocolo establecido en el laboratorio (Ávila-González et al, 2019; García-Castro et al 2015, García-López et al., 2019). Brevemente, las membranas fetales, se separaron mediante una disección mecánica el amnios del corión, posteriormente, se lavaron en tres ocasiones con solución balanceada de Hanks 1X para remover los coágulos de sangre adheridos al tejido y se incubó durante 5 minutos y dos periodos subsecuentes de 40 minutos con tripsina/EDTA a 37°C. Al finalizar dicho periodo, se inactivo la tripsina/EDTA con medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino y el tripsinizado se centrifugó durante 10 min a 200 x g a 4°C. Se re-suspendió el pellet en medio de cultivo (DMEM con suero fetal bovino al 10%) y se filtró mediante un separador con un límite de 100 µm. Finalmente, las células fueron sembradas a una densidad de 170,000 células por cm² en medio de cultivo adicionado con EGF (Factor de Crecimiento

Epidérmico 10 ng/ml), sobre cajas de plástico de 10cm^2 . Una vez alcanzada una confluencia celular del 80%-90% se procedió a realizar un pasaje celular hacia cajas de 4 pozos.

7.3 Protocolo de Diferenciación hacia precursores β pancreáticos.

Una vez alcanzada una confluencia del 80-90 % del cultivo celular en las cajas previamente sembradas se procedió con el protocolo de diferenciación reportado por Schulz y colaboradores (2012) (veáse Figura 7). Brevemente, durante la primera etapa de inducción hacia células del endodermo definitivo (dos días), las CEAH se mantuvieron en medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (del inglés FBS) 0.2 %, ITS (Insulina/Transferrina/Selenio), Glutamax 1X y Penicilina/ Estreptomicina adicionando durante el primer día Activina (100 ng/ml) y Wnt (50 ng/ml) y en el segundo sólo la primera molécula. En la segunda etapa (etapa de tubo del intestino primitivo), las células se mantuvieron en medio de cultivo de la primera etapa por tres días, agregando factor de crecimiento de queratinocitos (del inglés KGF a 25 ng/ml) y un inhibidor de la familia de tirosina cinasas (TBI, a una concentración de 2.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) por tres días. Para la obtención de células del intestino anterior-posterior, fueron cultivadas en medio DMEM, B27 1%, Glutamax 1X y Penicilina/Estreptomicina, agregando un análogo del ácido retinoico (TTNPB, 3Nm/ml), ciclopamina (0.25 $\mu\text{M}/\text{ml}$) y nogina (50 ng/ml) por tres días. Finalmente, durante la cuarta etapa (etapa de progenitores pancreáticos y precursores endocrinos) se mantuvieron por cuatro días en medio DMEM B27 1%, Glutamax 1X y Penicilina/Estreptomicina suplementado con nogina (50 ng/ml), KGF (25 ng/ml) y factor de crecimiento endotelial (del inglés EGF 50 ng/ml).

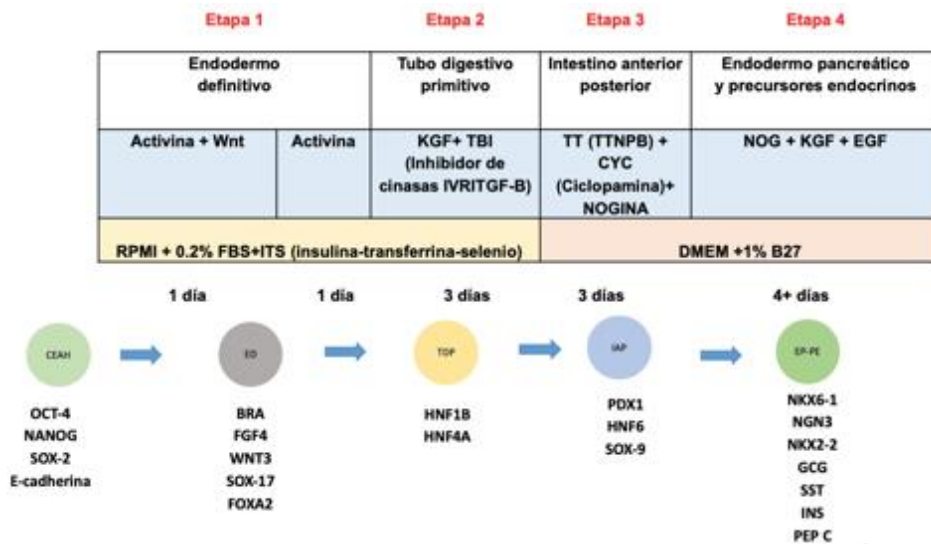


Figura 7. Protocolo de diferenciación dirigida para la obtención de células insulina positivas. El protocolo de diferenciación se divide en cuatro etapas, partiendo de CEAH (que expresan FT relacionados a la pluripotencia) que fueron diferenciándose hacia células del endodermo definitivo, tubo digestivo primitivo, intestino antero-posterior y finalmente endodermo pancreático y precursores endócrinos. En la tabla superior se observan las moléculas que activan vías de señalización para la diferenciación orquestada de las células, en la parte inferior se observa los medios de cultivo y los suplementos para su mantenimiento *in vitro*. En círculos y debajo de ellos se muestran los FT y hormonas que se usaron para caracterizar a las células en cada etapa. KGF: Factor de crecimiento de Queratinocitos del inglés *Keratinocyte Growth Factor* TBI: inhibidor de la familia de tirosina cinasas NOG: Nogina: EGF: Factor de crecimiento epidermal por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor* FBS: Suero fetal Bovino.

7.4 Ensayos de inmunocitoquímica

Para este fin, se basó en el procedimiento reportado previamente en el laboratorio (García-Castro et al., 2015, García-López et al., 2019). De manera concisa, las células fueron fijadas al final de cada etapa mediante paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en tres ocasiones con una solución de buffer fosfatos (PBS) y se permeabilizaron con suero pre-inmune al 10% y tritón al 0.3% durante 45 minutos. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios para la primera etapa con anti-Brachyury (BRA) (conejo 1:100) (Abcam ab20680) anti-FGF4 (cabra 1:50) (Santa Cruz, Sc 1361) y anti-Wnt 3 (WNT-3) (conejo 1:100) (Abcam ab28472); para la segunda etapa con anti-SOX-17 (ratón 1:50) (Abcam ab84990), anti-FOX-A2 (conejo 1:100) (Abcam ab40874), anti-HNF1B (conejo 1:50) (Santa Cruz Sc-22840) y anti-HNF4A (conejo

1:100) (Abcam ab64911); para la etapa tres se usó anti-PDX1 (conejo 1:2000) (Abcam ab47267), anti- HNF6 (ratón 1:100) (Abcam ab87420), anti-SOX-9 (ratón1:100) (Abcam ab 118892), anti-NKX6-1 (cabra 1:50) (Santa Cruz Sc 15030), anti-neurogenina 3 (NGN3) (ratón 1:100) (Abcam ab 87108) y anti-NKX2-2 (conejo 1:100) (Santa Cruz Sc-25404). Finalmente, para la etapa cuatro se empleó anti-glucagón (GCG) (conejo 1:50) (Santa Cruz Sc-13091), anti-somatostatina (SST) (ratón 1:50) (Santa Cruz Sc-55565), anti-insulina (conejo 1:100) (AbcamAb63820) y anti péptido C (PEP C) (ratón 1:100) (Abcam Ab8297). Posteriormente, las células fueron lavadas en tres ocasiones con PBS y albúmina bovina al 10% y se adicionaron anticuerpos secundarios acoplados a compuestos fluorescentes (1:1000). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 ng/ml). Se realizaron una serie de controles, los cuales consistieron en omitir el anticuerpo primario (negativo) y la presencia del anticuerpo en tejido pancreático de diferentes etapas de la vida intrauterina (positivo) y en tejido adulto placentario (negativo). Las tinciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX-81, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara CCD (Hamamatsu, ORCA-Flash 28, Tokyo, Japan).

7.5 Conteo celular

Se capturaron microfotografías con el objetivo 10X (NA 0.4, apertura numérica del inglés *numerical aperture* 0.4) y se contabilizó el número de células positivas en nueve campos aleatorios de un total de cinco experimentos independientes. Las imágenes fueron empalmadas con el programa Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe System Inc., CA, USA). Se determinó el porcentaje de células positivas para cada anticuerpo de cada experimento siendo el resultado de la división entre el número de células positivas para el marcador específico multiplicado por cien y el número total de núcleos (positivos a DAPI).

7.6 Ensayos de PCR-punto final

En cada una de las etapas del protocolo se determinó la expresión génica (RNAm) de los distintos factores de transcripción (García-Castro et al., 2015, Garcia-López et al., 2019). Para ello, se aisló el RNA de los cultivos celulares utilizando el método de trizol. El RNA se trató con DNAsa para evitar la amplificación de secuencias contaminantes de DNA. Posteriormente, 1250 ng de RNA fue utilizado y se realizó la PCR- punto final con el kit one-step (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Con el uso de pares específicos de *primers* (**OCT4** (FWD 5' GAG GAG TCC CAG GAC ATG AA- 3' REV 5' GTG GTC TGG CTG AAC ACC TT 3') **NANOG** (FWD5'GCC GAG TGG AAA CTT TTG TC 3' REV5' GTT CAT GTG CGCGTA ACT GT3'), **SOX2** (FWD5' CAG CTG TGT GTA CTC AAT GATAGA TTT3' REV5'CAA CTG GCC GAA GAA TAG CAA TGG TGG TGT 3'), **BRA** FWD 5'CAG TGGCAG TCT CAG GTT AAGAAG GA 3' REV 5'CGC TAC TGC AGG TGT GAG CAA 3' **SOX 17** FWD 5' CTG TTG AAT CAT AAG CTT GAC CGT CCC3' REV 5' ATC TTA ACC CCA GCG ATG CTT GCC 3' **FOXA-2** FWD 5'GGG AGC GGT GAA GAT GGA 3' REV 5'TCA TGT TGC TCA CGG AGG AGT A 3' **HNF4-A** FWD 5'CAT GGC CAA GAT TGA CAA CCT 3' REV 5' TTC CCA TAT GTT CCT GCA TCA G 3' **HNF-1B** FWD 5'TCA CAG ATA CCA GCA TCA GT 3' REV 5' GGG CAT CAC CAG GCT TGT A 3' **PDX-1** FWD 5' AAG TCT ACC AAA GCT CAC GCG 3' REV 5' GTA GGC GCC TGC 3' **HNF-6** FWD 5' CGC TCC GCT TAG CAG CAT 3' REV 5' GTG TTG CCT CTA TCC TTC CCA T 3' **SOX-9** FWD 5'AGT ACC CGC ACT TGC ACA AC 3' REV 5' ACT TGT ATT CCG GGT CCTT 3' **NKX6-1** FWD 5' CTG GCC TGT ACC CCT CAT CA 3' REV 5' CTT CCC GTC TTT GTC CAA 3' **NGN-3** FWD 5'GCT CAT CGC TCT CTA TTC TTT TGC 3' REV 5' GGT TGA GGC GTC ATC CTT TCT3' **NKX2-2** FWD 5'GGC CTT CAG TAC TCC CTG CA 3' 5'GGG ACT TGG AGC TTG AGT CCT 3' **GCG** FWD 5' AAG CAT TTA CTT TGT GGC TGG ATT 3' REV 5'TGA TCT GGA TTT CTC TGT GTC T 3' **SST** FWD 5'CCC CAG ACT CCG TCA GTT TC 3' REV 5'TCC GTC TGG TTG GGT TCA G 3' **INS** 5'AAG AGG CCA TCA AGC AGA TCA 3' 5'CAG GAG GCG CAT CCA CA 3') se determinó la presencia de RNAm para cada gen de interés. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 94°C por un

minuto, alineamiento de 56 a 57°C dependiendo del *primer* por un minuto y elongación 68°C por un minuto. El número de ciclos fue de 35 y la extensión final a 68°C por diez minutos terminada por un enfriamiento a 4°C. Asimismo, en la amplificación se incluyeron controles negativos en donde se omitió la enzima, para descartar falsos positivos, así como controles positivos a partir de RNAm de Páncreas de fetos en etapas tempranas de desarrollo. Los fragmentos resultantes de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de Agarosa al 4% y el tamaño de los productos fueron determinados mediante su comparación con estándares de peso molecular.

8. Resultados

8.1 Obtención y caracterización de las CEAH *in vitro*

Se obtuvieron CEAH con una morfología tipo adoquín con núcleos grandes y citoplasma pequeño, las cuales crecieron en monocapa. De forma esperada, confirmamos la presencia de los marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG mediante las técnicas de inmunofluorescencia (tinción nuclear de cada una de las moléculas buscadas) y PCR (bandas de pares de base de acuerdo con lo reportado en la literatura). Asimismo, las células fueron E-Cadherina positivas lo cual comprueba su naturaleza epitelial (veáse Figura 8 y 9).

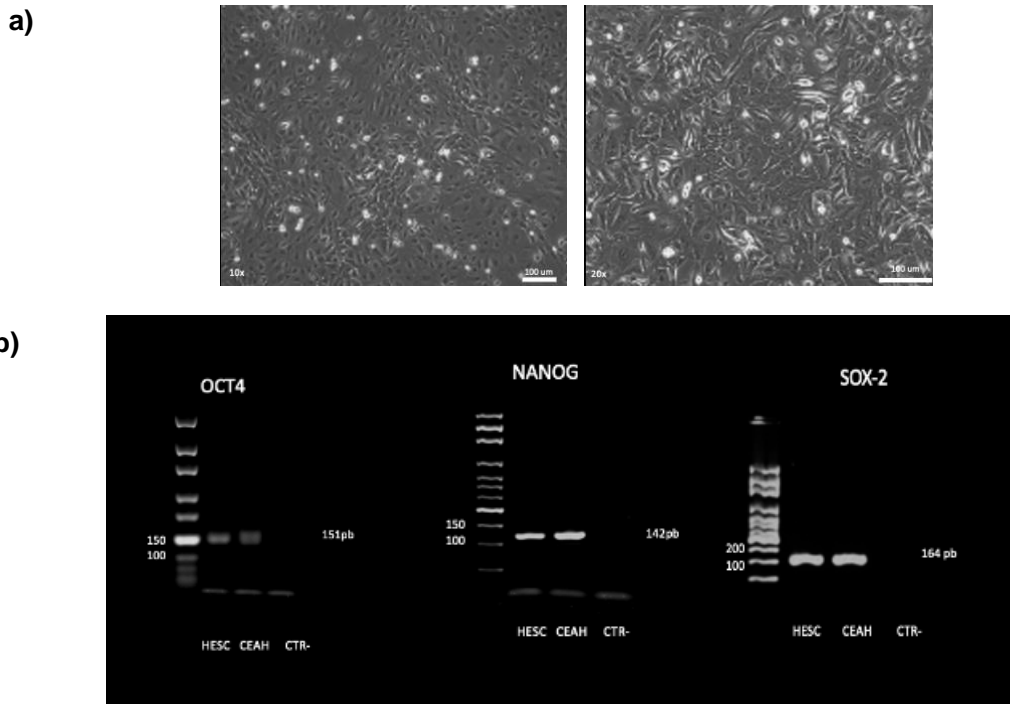


Figura 8. Caracterización de las CEAH *in vitro*. a) Microfotografías en campo claro a diferentes aumentos de las CEAH en donde se aprecia su morfología de adoquín agrupadas en monocapa durante el primer pasaje celular (Objetivos 10x y 20x) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes. Barra de escala= 100μm). b) Expresión de factores de transcripción correspondientes a OCT4 (151 pb), NANOG (142 pb) , y SOX2 (264 pb) analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde se observa el control positivo de células troncales embrionarias humanas (HESC del inglés *Human Embryonic Stem Cells*), CEAH durante el primer pasaje en el carril central y finalmente el control negativo donde se omitió RNAm durante la reacción PCR (CTR-) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes).

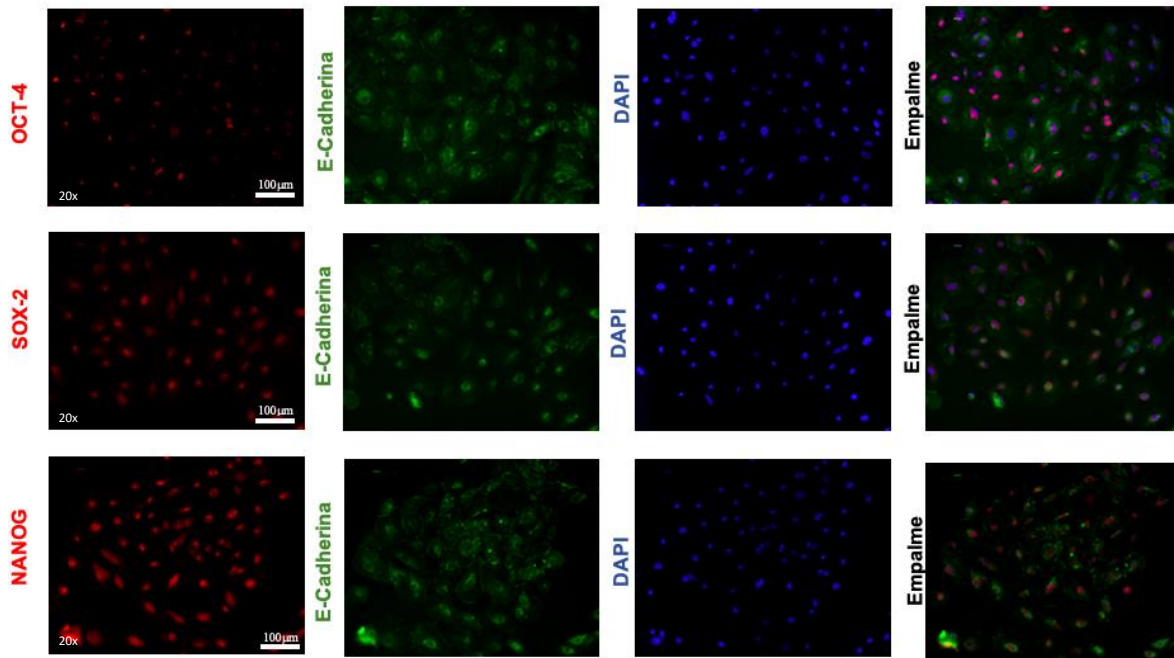


Figura 9. Caracterización de las CEAH *in vitro* mediante marcadores de pluripotencia Microfotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia a 20x de ensayos de inmunocitoquímicas que determinaron la presencia de los factores de pluripotencia OCT-4, NANOG y SOX-2 (rojo), los cuales colocalizan con E-cadherina, (verde) en las CEAH al final del primer pasaje celular. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barras de escala se aplica para el resto de las imágenes (Barra de escala= 100 µm).

8.2 Protocolo de diferenciación pancreática a partir de CEAH

Una vez caracterizadas las CEAH en condiciones *in vitro* y alcanzada una confluencia de 80 a 90% se realizó el protocolo de diferenciación dirigida de cuatro etapas. De manera interesante, las células presentaban los marcadores de diferenciación celular característicos de cada etapa los cuales fueron determinados mediante la expresión de RNAm (PCR-punto final) y la presencia de la proteína (inmunoensayos).

Durante la primera etapa, las CEAH se diferenciación hacia el endodermo definitivo bajo una estimulación con WNT y Activina. De manera oportuna, mediante los experimentos de PCR se apreció la expresión de los factores de transcripción correspondientes a dicha etapa (figura 11). Además, mediante los ensayos de inmunofluorescencia se observó una marca nuclear para cada uno de los factores, mientras que el conteo demostró los siguientes porcentajes de la

población total de BRA (63.64% +/-22.58), FGF4 (42.75% +/- 11.83), WNT3A (71.16% +/-9.69), SOX17 (34.05% +/-12.09) y FOXA2 56.62% +/- 11.76) al final de esta fase (veáse Figura 10, 11 y 12). Más adelante, al terminar la segunda etapa (tubo digestivo primitivo) y con la estimulación del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el inhibidor de la familia de tirosina cinasas (TBI), las CEAH mostraron la presencia tanto del RNA mensajero como de la proteína HNF1B y HNF4A (50.62% +/- 11.75 y 34.31% +/- 23.67, respectivamente) (veáse Figura 13, 14 y 15). Para la obtención de células del intestino anterior-posterior (tercera etapa) las CEAH se les agregó al medio de incubación TTNPB, ciclopamina y nogina con lo cual fueron capaces de expresar el RNAm (PDX1 y SOX9) y la proteína de PDX1 (74.88% +/- 14.19), HNF6 (6.22% +/- 4.006) y SOX9 (59.85% +/-23.22) en los porcentajes descritos (veáse Figura 16, 17 y 18). Finalmente, al completar la etapa 4 (etapa de progenitores pancreáticos y precursores endocrinos) las células al ser cultivadas con Nogina, KGF y EGF expresaban el RNA m de las hormonas glucagón (GCG), insulina (INS) y péptido C (PEP-C), así como las proteínas de los marcador específicos de páncreas, NKX2 74.26 % +/-17.9, GCG 76.46% +/-11.8, INS 64.1% +/- 4.05 y PEP-C 35% +/-9.83 en los porcentajes previamente señalados (veáse Figura 19, 20 y 21)

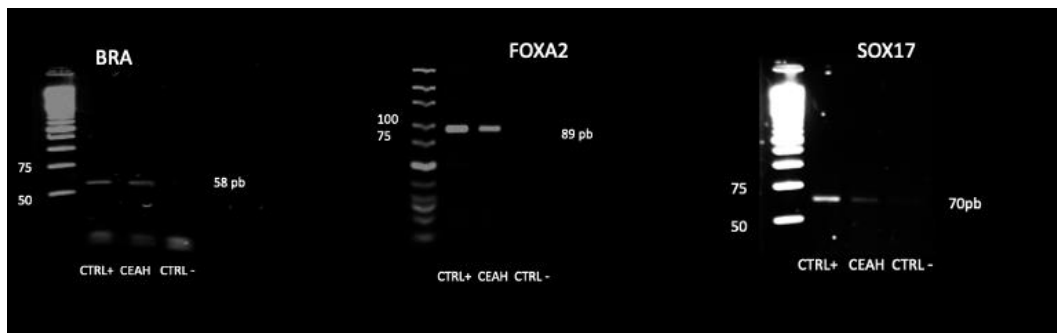


Figura 10. Expresión de Factores de Transcripción correspondientes al endodermo definitivo en CEAH al final de la primera etapa de diferenciación. Expresión de factores de transcripción correspondientes a BRA (58 pb), FOXA2 (89 pb) y SOX17 (70 pb) , y SOX2 (264 pb) analizados posterior a la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde se observa el control positivo de tejido pancreatico fetal (CTRL +) CEAH al finalizar la primera etapa en el carril central y finalmente el control negativo donde se omitió RNAm durante la reacción PCR (CTR-) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes).

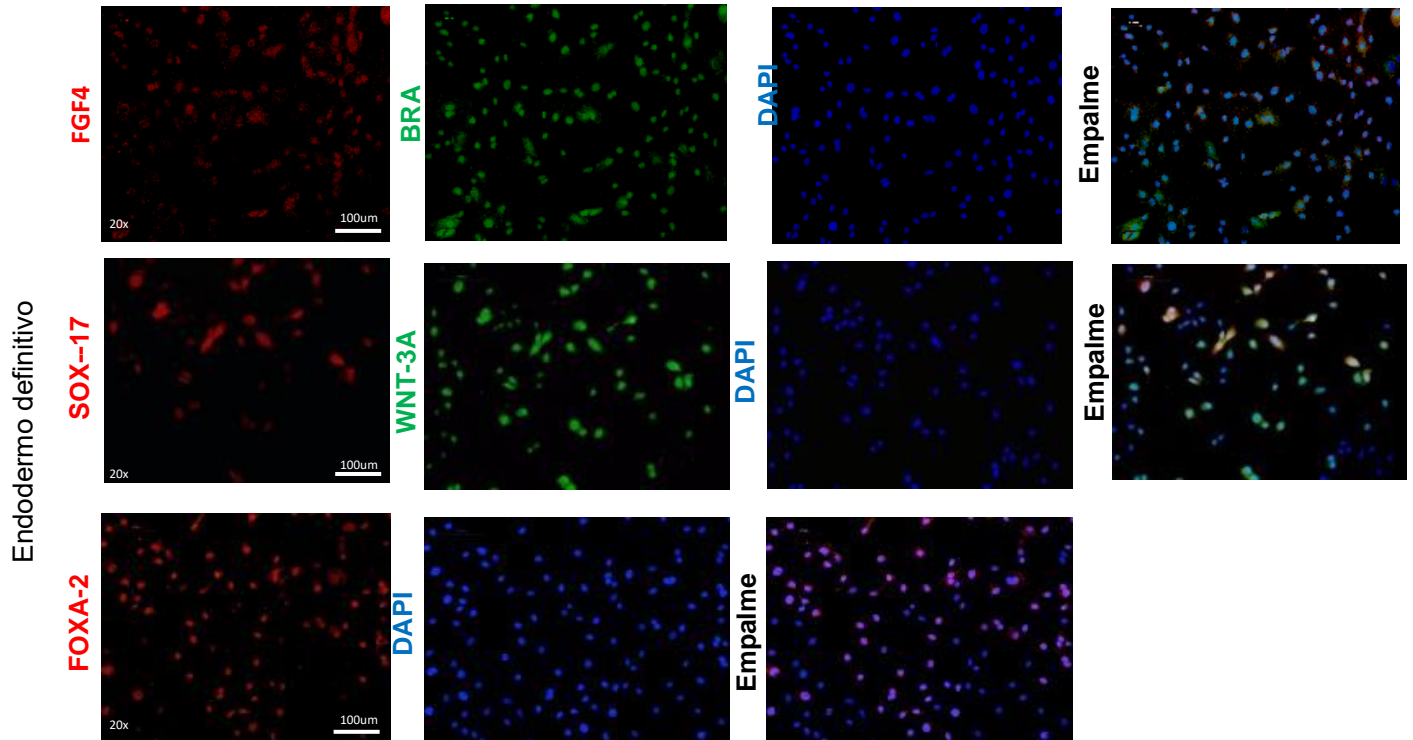


Figura 11. Caracterización de las CEAH al final de la primera etapa (endodermo definitivo). Microfotografías representativas tomadas por microscopia de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción característicos del endodermo definitivo FGf4 (rojo), BRA (verde), SOX17 (rojo) WNT3A (verde) y FOXA2 (rojo) en el segundo día de la Etapa 1 del protocolo de diferenciación pancreática. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barra de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 µm).

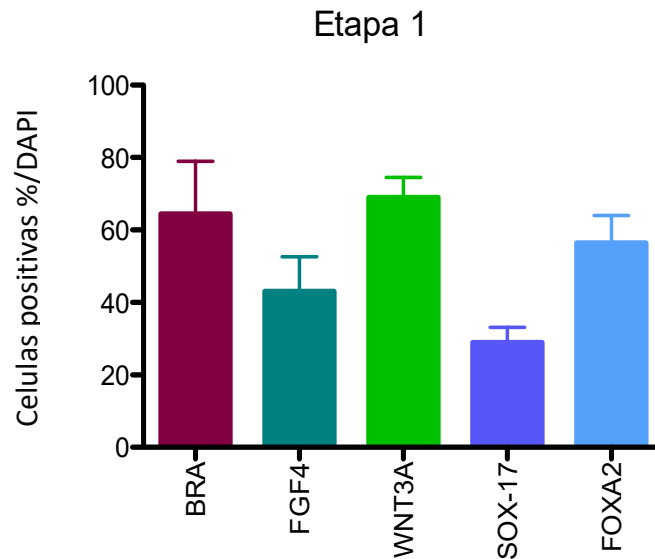


Figura 12. Cuantificación de células positivas a factores de transcripción en etapa de endodermo definitivo. Las barras representan el porcentaje de células positivas a factores de transcripción BRA, FGF4, WNT3A, SOX17 y FOXA2 en las CEAH tras la diferenciación en la primera etapa del protocolo de diferenciación celular. La cuantificación del porcentaje de células esta expresada con relación de células teñidas con DAPI. Los resultados se observan como medias \pm SD (desviación estandar del inglés *standard deviation*) de un total de cinco experimentos independientes.

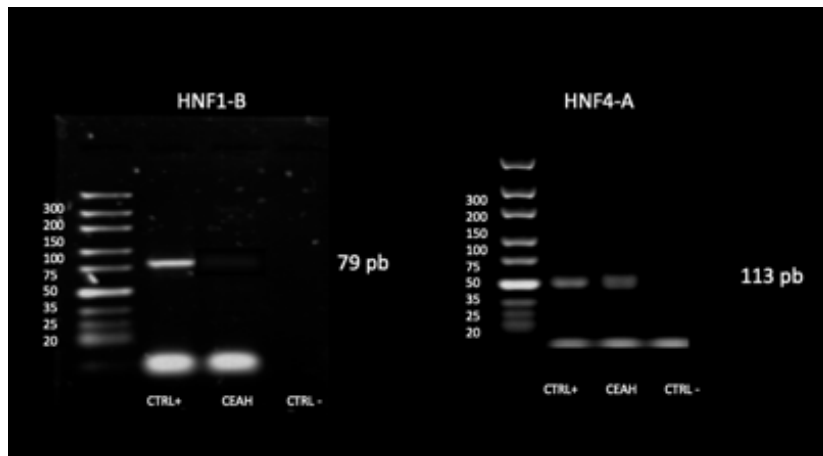


Figura 13. Expresión de RNAm correspondientes a factores de transcripción del tubo digestivo primitivo en CEAH al final de la segunda etapa de diferenciación. Expresión de factores de transcripción correspondientes a HNF1B (79 pb) y HNF4A (113 pb), analizados posterior a la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde se observa el control positivo de tejido pancreatico fetal (CTRL +) CEAH al finalizar la segunda etapa en el carril central y finalmente el control negativo donde se omitió RNAm durante la reacción PCR (CTR-) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes).

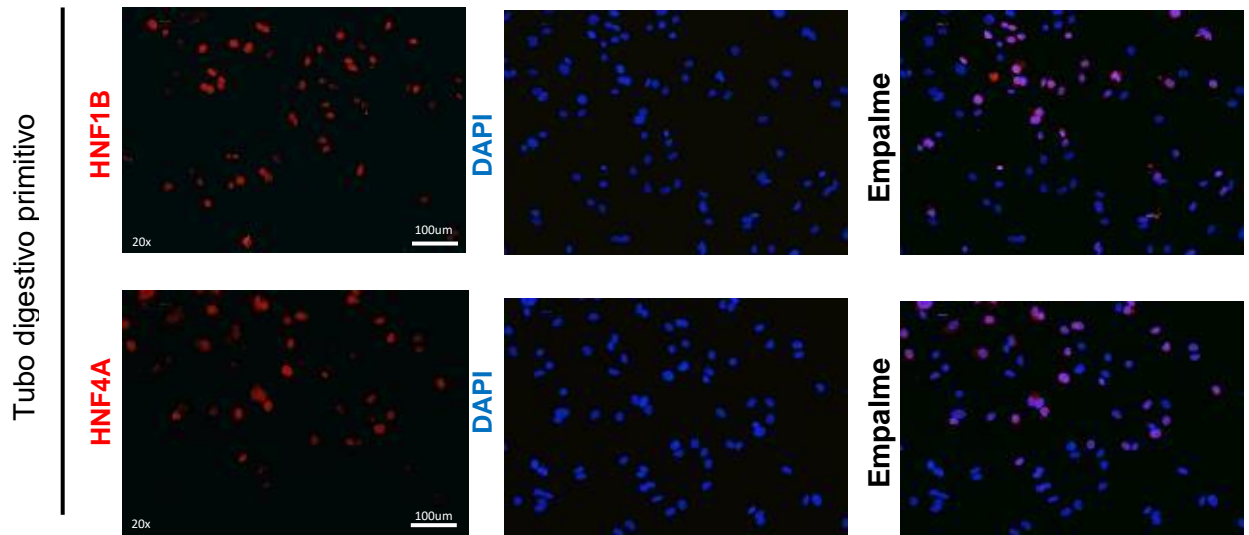


Figura 14. Caracterización de las CEAH al final de la segunda etapa (tubo digestivo primitivo) Microfotografías representativas tomadas por microscopia de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción característicos del tubo digestivo primitivo HNF1B (rojo), HNF4A (rojo) al finalizar el tercer día de la Etapa 2 del protocolo de diferenciación pancreática. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barras de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 μ m).

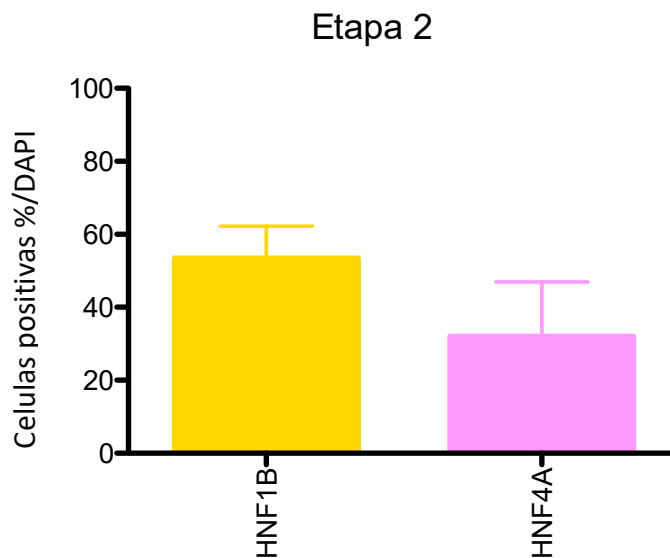


Figura 15. Cuantificación de células positivas a factores de transcripción en etapa de tubo digestivo primitivo Las barras representan el porcentaje de células postivas a factores de transcripción HNF1B y HNF4A en las CEAH tras la diferenciación en la segunda etapa del protocolo de diferenciación celular. La cuantificación del porcentaje de células esta expresada con relación de células teñidas con DAPI. Los resultados se observan porcentaje de las como medias +/- SD (desviación estandar del inglés *standard deviation* de un total de cinco experimentos independientes).

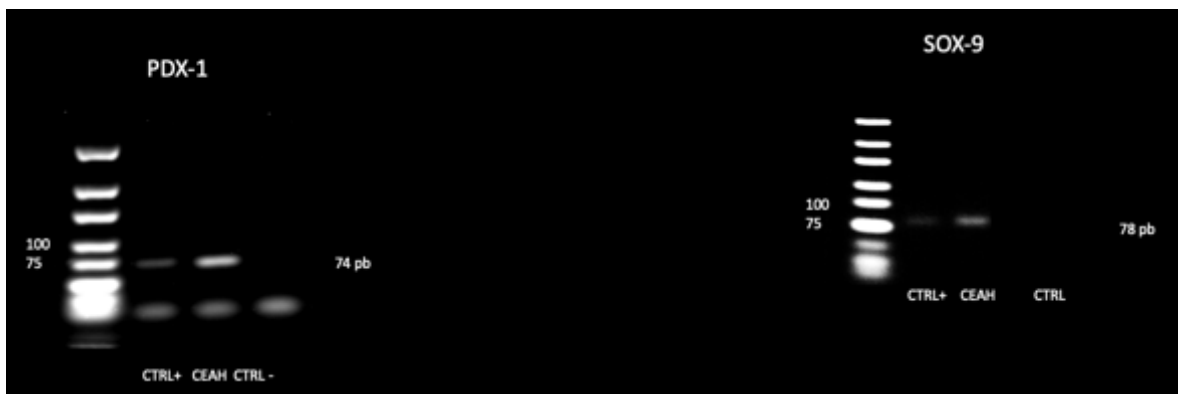


Figura 16. Expresión del RNAm correspondientes a los factores de transcripción del tubo digestivo anterior-posterior en CEAH al final de la tercera etapa de diferenciación. Expresión de factores de transcripción correspondientes a PDX1 (74 pb) y SOX9 (78 pb), analizados posterior a la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde se observa el control positivo de tejido pancreatico fetal (CTRL +) CEAH al finalizar la segunda etapa en el carril central y finalmente el control negativo donde se omitió RNAm durante la reacción PCR (CTR-) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes).

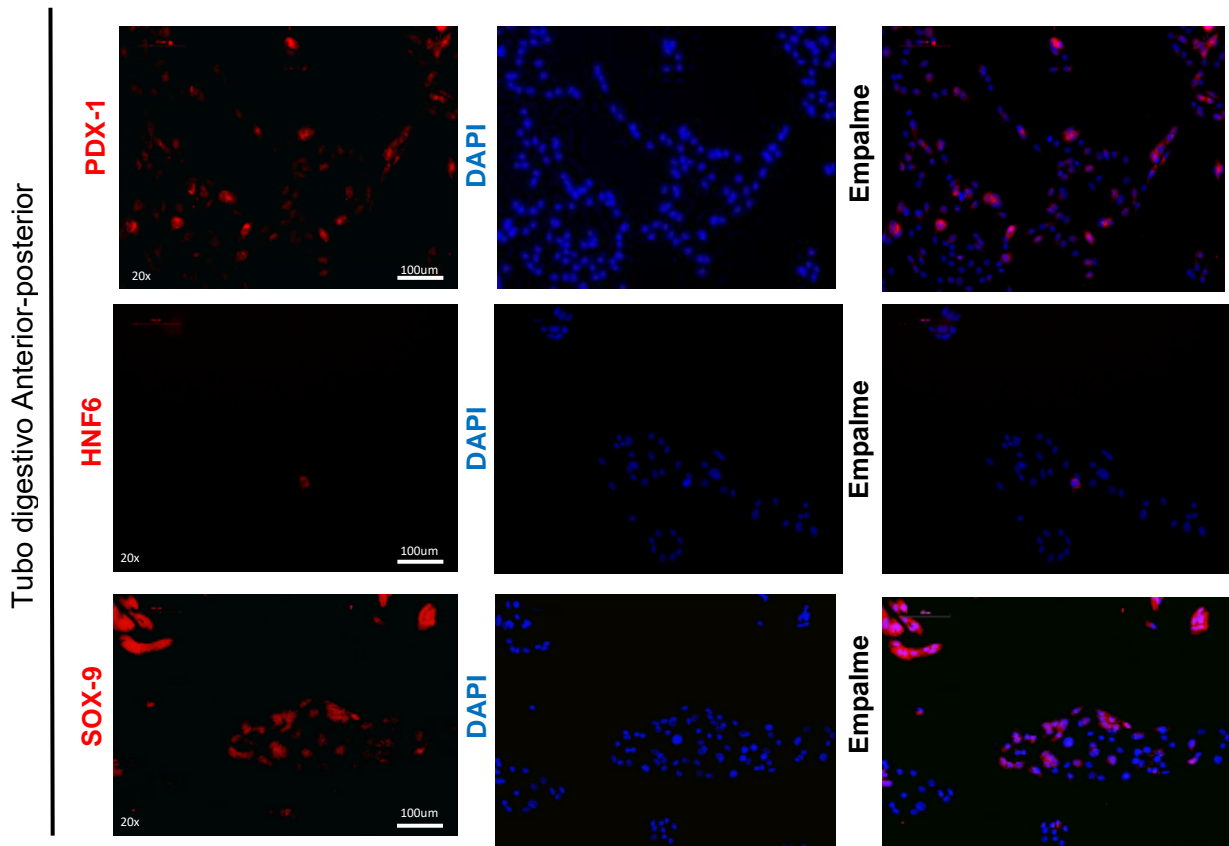
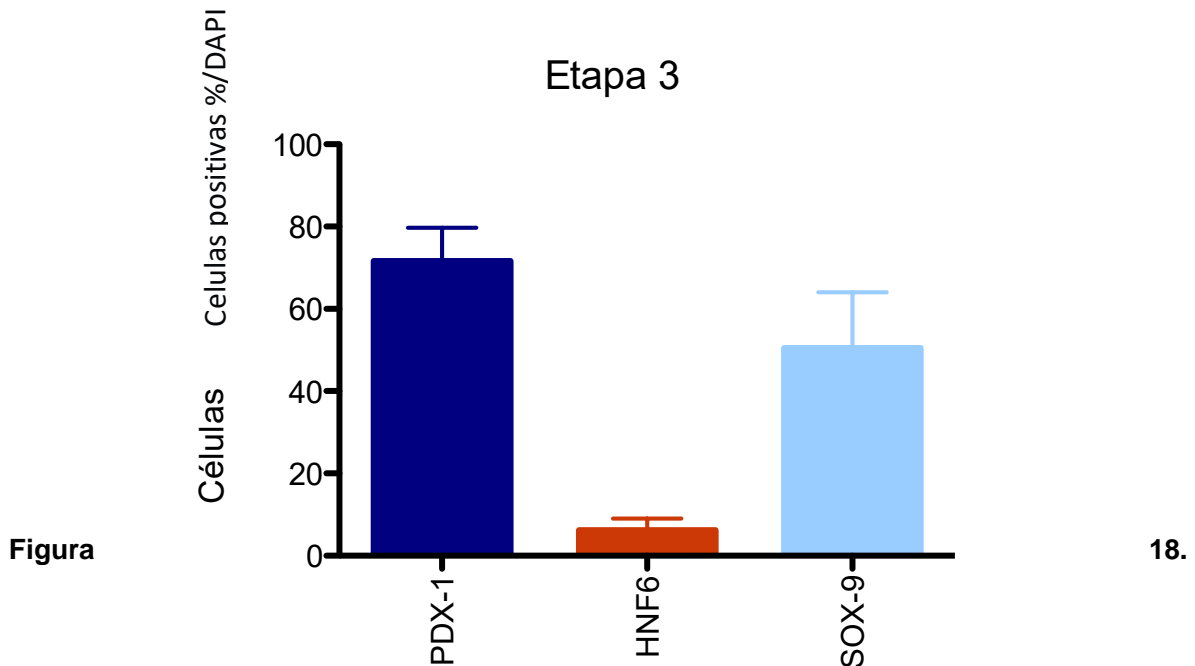


Figura 17. Caracterización de las CEAH al final de la tercera etapa (tubo digestivo anterior-posterior). Microfotografías representativas tomadas por microscopia de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción característicos del del tubo digestivo antero-posterior: PDX-1, HNF6 y SOX-9 (rojo). Al finalizar el tercer día día de la etapa 3 del protocolo de diferenciación pancreatica. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barras de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 µm).



Caracterización de las CEAH al final de la tercera etapa (tubo digestivo anterior-posterior). Las barras representan el porcentaje de células positivas a factores de transcripción PDX-1, HNF6 y SOX-9 en las CEAH tras la diferenciación en la segunda etapa del protocolo de diferenciación celular. La cuantificación del porcentaje de células esta expresada con relación de células teñidas con DAPI. Los resultados se observan como medias +/- SD de un total de cinco experimentos independientes.

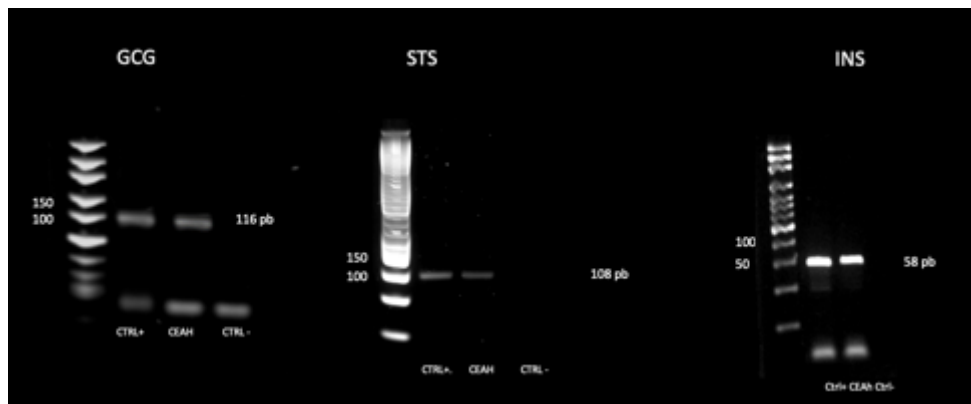


Figura 19. Expresión de hormonas correspondientes a los factores de transcripción de células del endodermo pancreático y precursores endocrinos al final del protocolo de diferenciación. Expresión de factores de hormonas correspondientes a glucagón (GCG, 116 pb), somatostatina (SST, 108 pb) e insulina (INS, 58 pb) analizados posterior a la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% donde se observa el control positivo de tejido pancreático fetal (CTRL +) CEAH al finalizar la segunda etapa en el carril central y finalmente el control negativo donde se omitió RNAm durante la reacción PCR (CTR-) (Imágenes representativas de cinco experimentos independientes).

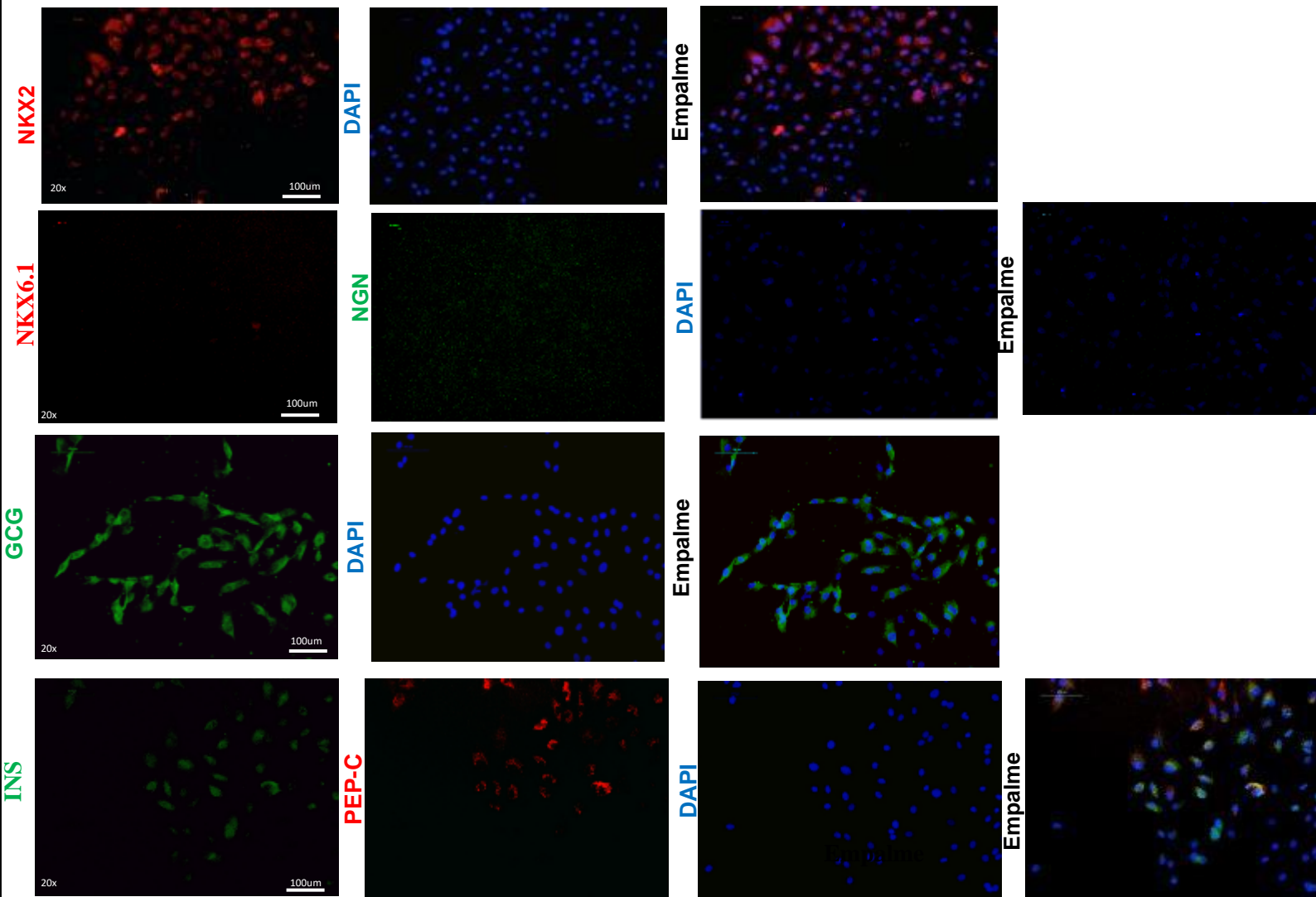


Figura 20. Caracterización de las CEAH al final del protocolo de diferenciación (endodermo definitivo). Microfotografías representativas tomadas por microscopia de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción característicos del endodermo pancreático y precursores endocrinos NKX2.2 y NKX6.1 (rojo), neurogenina (NGN, verde), glucagón (GCG, verde), insulina (INS verde), péptido C (PEP-C rojo) y somatostatina (SST rojo). al finalizar el cuarto día de la Etapa 4 del protocolo de diferenciación pancreática. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barras de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 μ m).

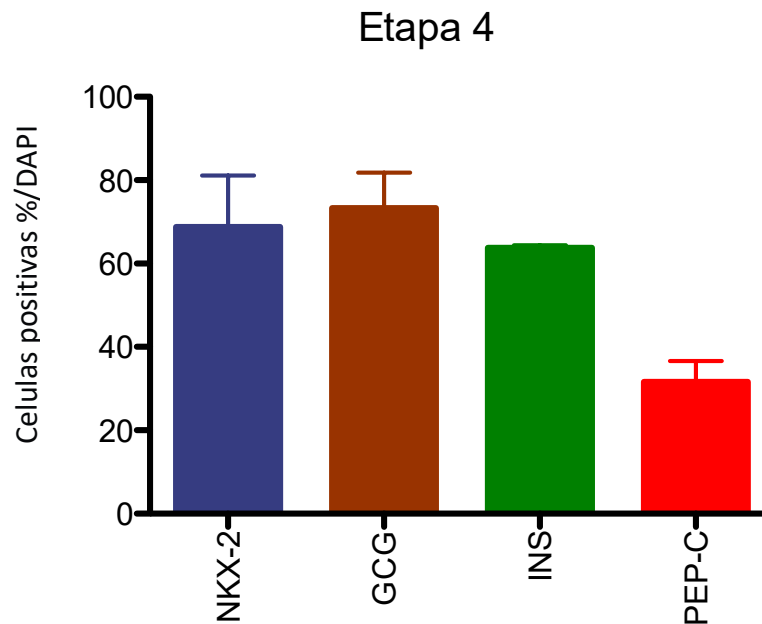


Figura 21. Caracterización de las CEAH al final del protocolo de diferenciación (endodermo definitivo). Las barras representan el porcentaje de células positivas a factores de transcripción NKX2, GCG, INS y PEP-C en las CEAH tras la diferenciación en la segunda etapa del protocolo de diferenciación celular. La cuantificación del porcentaje de células esta expresada con relación de células teñidas con DAPI. Los resultados se observan como medias +/- SD de un total de cinco experimentos independientes.

De manera interesante, tras la obtención de células progenitoras endocrinas al finalizar la cuarta etapa del protocolo, se logran obtener poblaciones heterogéneas que componen al islote pancreático capaces de ser inmunorreactivas a la marca de INS y SST. Sin embargo, al observar las imágenes del empalme en las células INS+ y SST+, ambas marcas no colocalizaban, lo que sugiere la existencia de poblaciones capaces de expresar un solo tipo de hormona (mono-hormonales) como se aprecia en la Figura 23. Además, al realizar la búsqueda de PEP-C a lo largo del protocolo de diferenciación se percató que su inmunoreactividad soló fue reflejada en las etapas que corresponden al tubo digestivo anteroposterior que localizaban con células PDX-1+, siendo mayor su número al final del protocolo (véase Figura 24).

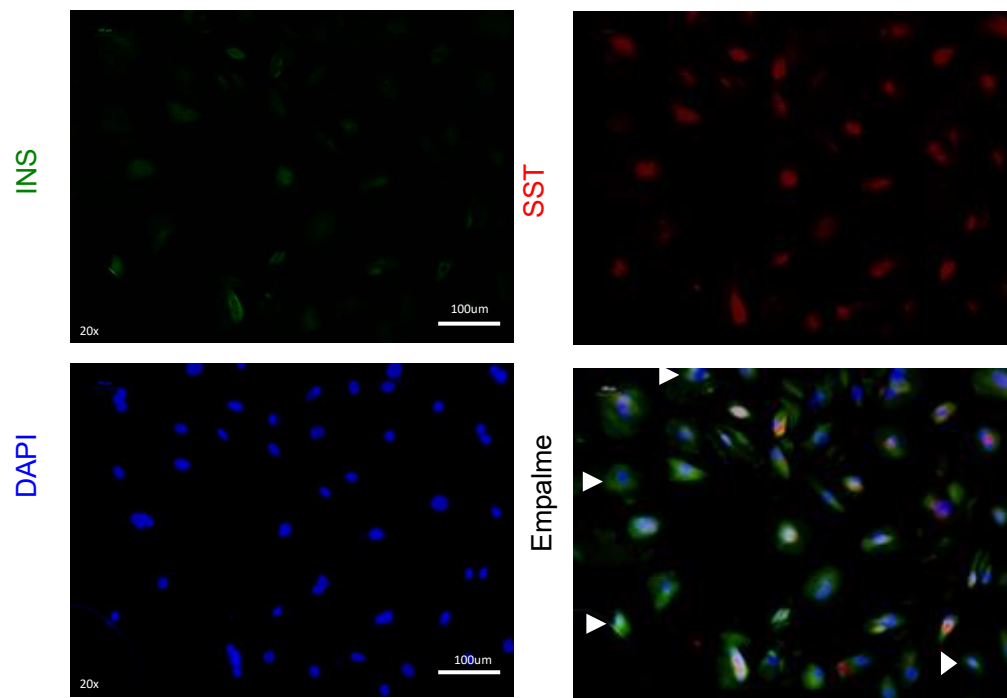


Figura 22. Identificación de células monohormonales al final del protocolo de diferenciación. Microfotografías representativas tomadas por microscopia de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción característicos del endodermo pancreático y precursores endocrinos insulina (INS verde) y somatostatina (SST rojo), al finalizar el cuarto día de la Etapa 4 del protocolo de diferenciación pancreática. Las puntas de las flechas señalan células que no empujaban para ambas hormonas, de esta manera se obtuvieron células monohormonales. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barra de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 µm).

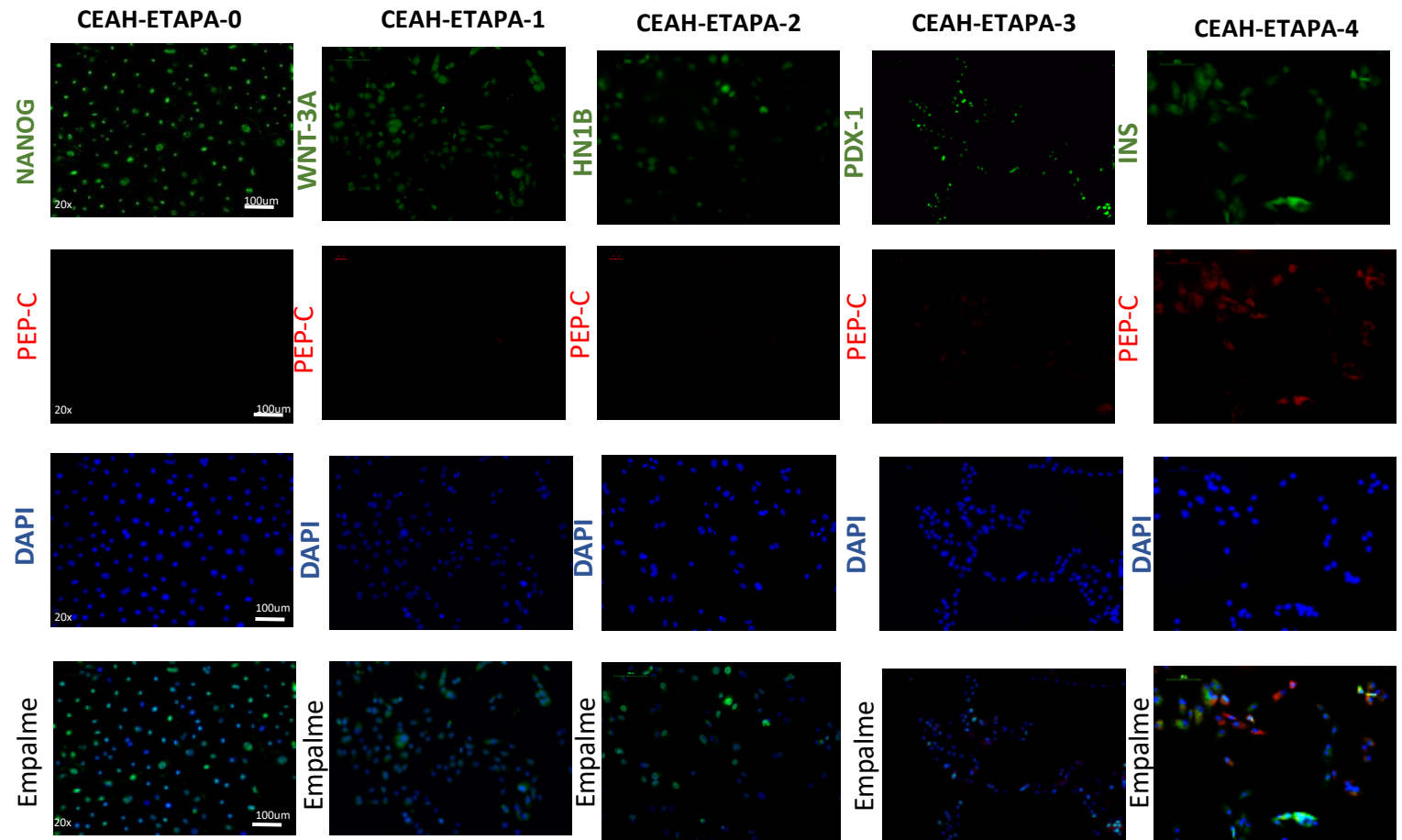


Figura 23. Diferenciación de células productoras de insulina y péptido C a lo largo del protocolo de diferenciación. Microfotografías representativas tomadas por microscopía de epifluorescencia (20x) donde se detectan factores de transcripción y hormonas características de las diferentes etapas del protocolo de diferenciación correspondientes a NANOG, WNT3-A, HN1B, PDX-1 e INS (verde) y PEP-C (rojo). al finalizar el cuarto día de la Etapa 4 del protocolo de diferenciación pancreática. Se observa la marca de PEP-C a partir de la tercera etapa, sin embargo, en más evidente en la cuarta etapa. Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con DAPI (azul). Las tinciones son representativas de cinco experimentos independientes. La barras de escala se aplica para todas las imágenes (barra de escala= 100 μ m).

9. Discusión

El establecimiento de una terapia eficiente en la DM ha sido un desafío en las últimas décadas. A pesar de los múltiples tratamientos hipoglucemiantes, desde la generación de fármacos que sensibilizan la liberación de insulina hasta sustituir por completo esta hormona de manera exógena o mediante el trasplante de tejido, no han brindado la certeza de disminuir las complicaciones agudas y crónicas de esta patología. Además de las contraindicaciones, efectos no deseados y la biodisponibilidad de los recursos biológicos (en el caso del trasplante) limitan aún más la eficiencia terapéutica.

Tras la propuesta de una terapia regenerativa a partir de CT y bajo el establecimiento de diferentes protocolos de diferenciación celular se han obtenido células productoras de insulina con el uso de CT embrionarias humanas provenientes de la masa celular interna de embriones, las cuales si bien han demostrado su utilidad en ensayos preclínicos en modelos animales (véase Tabla 1) aun presentan ciertos aspectos que deben de resolverse antes de que sean una realidad en el campo de la Medicina Regenerativa; como son problemas ético-legales hasta la posible formación de teratomas y el número limitado de ellas que representan a la población no anglosajona o asiática (Kuroda T et al., 2013; Volarevic V. et al., 2018).

De esta forma, bajo la premisa de que las CEAH presentan marcadores moleculares de CT pluripotentes y que podrían ser una fuente alterna a este tipo peculiar de células; en este trabajo se logró aislar y mantener en condiciones de cultivo a dicha estirpe celular. Como una primera aproximación se demostró que al aislar las células eran positivas a los factores de transcripción implicados en la pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) de manera esperada (véase Figura 8 y 9). Se ha descrito en la literatura que debido a su origen embrionario estas células pueden poseer marcadores similares a las CT embrionarias humanas e inclusive del epiblasto. De esta forma, Miki y colaboradores en 2005 demostraron la expresión de los antígenos de superficie TRA-1-60, TRA1-81, SSEA3 y SSEA4 en el epitelio amniótico placentario a término, como de OCT4, NANOG, SOX2 (Miki et al., 2005). Por su parte, Ilancheran y su grupo de investigación obteniendo resultados similares al trabajo de Strom, evidenciaron la presencia de la tríada de

pluripotencia (OCT-4, NANOG, SOX-2), así como SSEA4 y GCTM2 en las CEAH, logrando además, la derivación de linajes celulares de las tres capas germinales (Ilancheran et al., 2007). Por los hallazgos anteriormente mencionados diversos grupos de investigación han retado la capacidad de diferenciación de las CEAH, obteniendo así diversos grupos celulares funcionales provenientes del ectodermo, mesodermo y endodermo (Niknejad H. et al., 2010; Han X., et al., 2011; Luo H et al., 2011). Es por ello los últimos años el epitelio amniótico humano ha despertado el interés de la comunidad científica por sus características bioquímicas y moleculares casi equiparables con las CT embrionarias humanas (Evron A. et al., 2011; García-Castro et al., 2015, 2016, Zou G et al., 2018, Avila-Gonzalez, et al., 2019 García-López et al., 2019.) lo cual ha brindado evidencia suficiente sobre su posible uso como modelo de estudio tanto en la biología del desarrollo como en la Medicina Regenerativa.

En este estudio se retó a las CEAH mediante un protocolo de diferenciación secuencial hacia fenotipos celulares que convergen en precursores endocrinos dando lugar a células endocrinas maduras mediante la inactivación o activación de vías de señalización (conservadas en distintas especies) y con ello permitiendo la diferenciación orquestada hacia células b pancreáticas (Schulz et al., 2012). De esta forma, mediante este proceso de diferenciación dirigida, se trata de mimetizar las condiciones *in vivo* durante la etapa fetal, con el objetivo de disminuir esa equidistante distancia que ha existido para semejarse a los islotes humanos a partir de CT pluripotentes.

En este trabajo se lograron caracterizar mediante marcadores moleculares de etapas críticas del desarrollo pancreático diversas poblaciones. En una primera etapa se obtuvieron un células de BRA (63.64% +/-22.58), FGF4 (42.75% +/- 11.83), WNT3A (71.16% +/-9.69), SOX17 (34.05% +/-12.09) y FOXA2 56.62% +/- 11.76) (veáse Figura 10), seguidas por aquellas que expresaban HNF1B y HNF4A (53.7% y 37.4%, respectivamente) en la etapa del tubo digestivo primitivo (veáse Figura 12). Hacia la etapa de células del intestino anterior-posterior (tercera etapa) las CEAH fueron capaces de expresar el RNAm (PDX1 y SOX9) y la proteína de PDX1 (74.88% +/- 14.19), HNF6 (6.22% +/- 4.006) y SOX9 (59.85%+/-23.22) (veáse Figura 15). En

las últimas dos décadas se ha destacado la importancia de los FT PDX-1, HNF6 y NKX6.1, exclusivos del linaje pancreático y cruciales para el desarrollo de esta glándula (Slack J. M. (1995); McCracken et al, 2012). De manera interesante, se ha documentado que la inactivación del gen PDX-1 en ratones modificados genéticamente han dado como resultado la pérdida del fenotipo de las células pancreáticas y por consecuencia el desarrollo de DM, ya que el gen regula de manera positiva la expresión de insulina uniéndose y activando promotores para la expresión de dicha hormona, así como para el cotransportador de glucosa GLUT2 y el polipéptido amiloide de los islotes, mientras que se reprime la expresión de glucagón (Ahigren et al., 1997; Ahigren U et al., 1998; Gao N et al. 2008). Así mismo, en ratones homocigotos PDX-1 (-/-) el crecimiento y desarrollo se detiene en etapas tempranas de la organogénesis del páncreas, lo que conlleva a hipoplasia o en su defecto agenesia (Offield M et al, 1996; Jonsson J et al, 1994). Por otro lado, ratones heterocigotos PDX1 (+/-) para dicho gen han demostrado alteración en la tolerancia a la glucosa demostrando que este factor de transcripción es indispensable para la homeostasis de la glucosa incluso cuando no tiene alguna alteración anatómica (Stoffers. et al, 1997; Hollan A. et al., 2002). Es interesante observar que las CEAH sometidas al protocolo de diferenciación en este trabajo, durante la tercera etapa alcanzó el 74.88 % +/-14.19 para PDX-1 + lo que nos daría un indicio de que las células obtenidas provienen de una diferenciación similar a la que ocurre para el endodermo pancreático y que la presencia de PDX-1 permita la maduración de células endocrinas en nuestro protocolo.

Respecto a NKX6.1 se ha descrito que es un FT que regula de manera particular la identidad de las células beta pancreáticas y promueve su proliferación (Henseleit, K. et al 2005; Schaffer A. et al., 2010). Sander M y colaboradores reportaron que la inactivación de NKX6.1 en ratones evita la generación de células b mono-hormonales, dando lugar a poli hormonales no funcionales (Sander M et al, 2000). Así mismo, mediante la combinación de perfiles de expresión génica e inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación masiva se demostró que NKX6.1 condiciona la expresión de genes promotores que permiten la biosíntesis y secreción de insulina, además de aquellos que promueven la proliferación de células b, sin embargo, la

deleción de este FT promueve la activación ectópica de los genes *d* en las células *b*, convirtiéndolas en linajes endocrinos alternativos (Taylor B. et al, 2013).

Este gen podría ser el responsable de la determinación de diferentes tipos celulares pancreáticos y capaz de darle una identidad a las células β , razón por la cual podría obtenerse un porcentaje de células mono hormonales elevado. Sí bien en los resultados reportados en este protocolo, no se obtuvo células positivas a dicho FT, no se eximé que se obtuvieran células mono hormonales como lo demuestran las imágenes de inmunofluorescencia. Sin embargo, es un área de oportunidad para enriquecer a dicha población celular en futuras investigaciones en el laboratorio. Un posible acercamiento sería agregar un activador de PKC como TPB (activador de PKC; (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(trifluorometil) fenil)-2,4-pentadienoilamino), que ha demostrado ser un mecanismo esencial en la traducción de señales en eventos de proliferación y diferenciación tras la fosforilación de serinas/treoninas como lo demostró Rezanía y colaboradores en 2013. Otra alternativa que se ha propuesto es mantener por más días de diferenciación a los progenitores endocrinos con el objetivo de que puedan madurar *in viro* y por consiguiente incrementar FT de dichas células.

Otro hallazgo significativo en este trabajo fue el 6.22 +/- 4.006 % de células positivas a HNF6. Dicho gen ha sido ampliamente descrito en el tejido pancreático, así como el hígado. No obstante, la ausencia de este FT no compromete la diferenciación celular terminal de las células *b* durante el desarrollo pancreático, sin embargo, en modelos *knock out* de ratones puede verse comprometida aquellas poblaciones de células progenitoras multipotentes (Jacquemin P. et al. , 2000; Zhang H. et al, 2009). La inmunoreactividad que se evidenció para la la marca de HNF6 hace pensar que, si bien fue un porcentaje limitado en los progenitores, las células multipotentes pancreáticas se logran diferenciar a células endocrinas INS+ hasta en un 64.1 %.

Recapitulando los resultados, enfocados a la caracterización de precursores endocrinos y progenitores pancreáticos, se puede observar que existe un porcentaje celular positivas a INS y Pep C de 64.1 % y el 35 %, respectivamente. Dichas cifras superan al porcentaje de células obtenidas en los trabajos de D'Amour y colaboradores (D'Amour et al 2006) donde se

obtuvieron alrededor de 7.3 % (3-12 %) de células INS+. En artículos como el reportado por Russ y colaboradores en 2011 donde a partir de células MEL1, una línea celular obtenida a partir de células embrionarias humanas, lograron obtener un 60 % de células positivas a INS, tras someterse a un protocolo similar al reportado por D'Amour y colaboradores (Russ et al, 2011). De forma similar Pagliuca y colaboradores en el año 2014, sometieron dos líneas celulares obtenidas de manera distinta, HUES 8 (una línea celular derivada de embriones humanos) e hiPSC-1 (células pluripotentes inducidas humanas obtenidas a partir de fibroblastos humanos) a un protocolo de diferenciación como el reportado en este trabajo, donde se simula el desarrollo del páncreas humano obteniendo un porcentaje mayor al 30 % (Pagliuca et al 2014). De esta forma, en este trabajo con CEAH se obtuvo un porcentaje igual o mayor al reportado con CT embrionarias humanas, no obstante, en el caso de las células del amnios no conllevan todos los posibles impedimentos que se hablaron en la introducción de este trabajo para llevarlas a la práctica clínica.

Por otra parte, desde el descubrimiento de los protocolos de reprogramación celular descritos por Yamanaka y colaboradores, el uso de las iPSC humanas en el campo de la diferenciación pancreática ha sido fuente de estudio para diversos laboratorios, donde a partir de técnicas de reprogramación se ha logrado obtener células productoras de INS. Trabajos como los de Kunisada en 2012 donde a partir de cinco líneas de iPSC se lograron obtener células INS + en un 11.8 % (8.0-16 %) además de GCG+, SST + GHRL, subsecuentemente Millman en 2015 a partir de dos líneas derivadas de fibroblastos humanos sanos y una línea derivada de fibroblastos de portadores de DM tipo 1 se obtuvieron iPSC positivas para INS hasta en un 56% obteniendo además GCG + y SST+. Yabe a partir de las líneas TkDN4-M, 253 G1, 454e2 derivadas de fibroblastos humanos se lograron obtener células INS+ entre el 30 y 33.6% además de GCG + y SST+. De esta forma, nuevamente al comparar este tipo de células pluripotentes con las obtenidas del amnios humano, los porcentajes son muy similares o en algunos casos hasta mayores. Así mismo, cabe recordar si bien estas células son una revolución en el campo de la Medicina regenerativa, la conservación de la "memoria

epigenética” que puede prevalecer hace pensar en replantearse la posibilidad de ensayos clínicos.

Finalmente, en aquellos protocolos donde se han utilizado CEAH y la inducción endocrina a partir de la estimulación con nicotinamida han resultado poco eficaces y no recapitulan el desarrollo pancreático *in vitro*, además se ha descrito alteraciones en aquellas células productoras de INS, como la ausencia en los receptores H2 a Histamina que permite la correcta respuesta a estímulos para la liberación de insulina, algunos de estos trabajos se ven reflejados en la Tabla 2.

10. Conclusiones y perspectivas

En esta primera aproximación para obtener células similares a las β pancreáticas a partir de CEAH, se puede observar que la expresión de FT y proteínas a lo largo de las cuatro etapas, son equiparables con trabajos similares que usan CT embrionarias e iPSC, modelos que representan la tecnología de punta en el campo de la terapia celular. De esta forma, los resultados presentados en este estudio abren la posibilidad de utilizar a las CEAH como una posible fuente atractiva de CT y de obtención de células productoras de insulina. Asimismo, este modelo permitiría el probar fármacos hipoglucemiantes o con efectos sobre poblaciones celulares pancreáticas, estudiar procesos del desarrollo embrionario o mecanismos fisiológicos o patológicos de enfermedades pancreáticas, lo que representaría el verdadero “estado de arte” de las CEAH.

Sin embargo, aún es necesario comprobar sus propiedades fisiológicas *in vitro* e *in vivo* de una forma sólida, así como su respuesta adecuada a los cambios fisiológicos dentro de un modelo animal, la interacción con diversos sistemas, la viabilidad de las células después del trasplante, la respuesta del hospedado, su posible uso en modelos específicos de la DM como la respuesta a anticuerpos asociados a la DM tipo 1, entre otras incógnitas.

11. Referencias

- ADA. (2019). Management of Diabetes in Pregnancy: Standard medical care in diabetes. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education*.
- Al-Khawaga, S., Memon, B., Butler, A. E., Taheri, S., Abou-Samra, A. B., & Abdelalim, E. M. (2018). Pathways governing development of stem cell-derived pancreatic β cells: lessons from embryogenesis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(1), 364–389.
- Agulnick, A. D., Ambruzs, D. M., Moorman, M. A., Bhoumik, A., Cesario, R. M., Payne, J. K., Kelly, J. R., Haakmeester, C., Srijemac, R., Wilson, A. Z., Kerr, J., Frazier, M. A., Kroon, E. J., & D'Amour, K. A. (2015). Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo. *Stem cells translational medicine*, 4(10), 1214–1222.
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H (1997). Independent requirement for ISL1 in the formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. ;385:257–260.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., & Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & development*, 12(12), 1763–1768.
- Ávila-González, D., García-López, G., Díaz-Martínez, N. E., Flores-Herrera, H., Molina-Hernández, A., Portillo, W., Díaz, N. F (2019). In Vitro Culture of Epithelial Cells from Different Anatomical Regions of the Human Amniotic Membrane. *Vis. Exp.*(153), e60551.
- Balaji S, Zhou Y, Opara EC, Soker S. (2017). Combinations of activin A or nicotinamide with the pancreatic transcription factor PDX1 support differentiation of human amnion epithelial cells toward a pancreatic lineage. *Cell Reprogram.*;19(4):255–62.

- Banting F.G., C.H. Best. (1922). The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med*, 7 pp. 251-271
- Benirschke K.(2000). *Pathology of the human placenta*. Springer-Verlag. New York.
- Buhimschi, I.A., Jabr, M., Buhimschi, C.S., Petkova, A.P., Weiner, C.P., and Saed, G.M. (2004). The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 191, 1678-1687.
- Buta, C, David, R, Dressel, R, Emgard, M, Fuchs, C, Gross, U, Healy, L, Hescheler, J, Kolar, R, Martin, U, Mikkers, H, Muller, F J Schneider, R, K Seiler, A E, Spielmann, H and Weitzer, G (2013). Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays?. *Stem Cells Res*, 11, 552-62.
- Cahan, P Daley G Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 357-68.
- Cota-Coronado, A., Ramírez-Rodríguez, P. B., Padilla-Camberos, E., Díaz, éNstor F., Flores-Fernández, J. M., Ávila-González, D., & Diaz-Martinez, N. E. (2019). Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders: from drug discovery toward precision medicine. *Drug Discovery Today*, 24(1), 334–341.
- D' Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., & Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 24(11), 1392–1401. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nbt1259>.
- Deglincerti, A., Etoc, F., Guerra, M. C., Martyn, I., Metzger, J., Ruzo, A., Simunovic, M., Yoney, A., Brivanlou, A. H., Siggia, E., & Warmflash, A. (2016). Self-organization of human embryonic stem cells on micropatterns. *Nature protocols*, 11(11), 2223–2232.
- Elwan MA, Sakuragawa N (1997) Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 8:3435–3438.

- ENSANUT. (2016). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (2016). Informe final de resultados. In Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaria de Salud (Vol. 2016). Retrieved from http://oment.uanl.mx/download/ensanut_mc2016.pdf.
- Enders, A. C., Schlafke, S., & Hendrickx, A. G. (1986). Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *The American journal of anatomy*, 177(2), 161–185.
- Evangelista, M., Soncini, M., & Parolini, O. (2008). Placenta-derived stem cells: New hope for cell therapy? *Cytotechnology*, 58(1), 33–42.
- Evans, J. (1972). The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol*, 28, 163-76.
- Evans M. (1981). Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation in tissue culture. *J reprod Fertil*, 62, 625-31. · Evangelista, M., Soncini, M., and Parolini, O. (2008). Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 58, 33-42.
- Evron, A., Goldman, S., & Shalev, E. (2011). Human amniotic epithelial cells cultured in substitute serum medium maintain their stem cell characteristics for up to four passages. *International journal of stem cells*, 4(2), 123–132.
- Federation, I. D. (2015). IDF Diabetes Atlas - 2015. In International Diabetes Federation.
- Feng, Q, Lu, S J, Klimanskaya, I, Gomes, I, Kim, D, Chung, Y, Honig, G R, Kim, KS and Lanza, R (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells*, 28. 704-12.
- Gao N, et al (2008). La regulación dinámica de los potenciadores de Pdx1 por Foxa1 y Foxa2 es esencial para el desarrollo del páncreas. *Genes Dev.*; 22 (24): 3435–48.
- García-Castro, I. L., García-López, G., Ávila-González, D., Flores-Herrera, H., Molina-Hernández, A., Portillo, W., ... Díaz, N. F. (2015). Markers of pluripotency in human amniotic epithelial cells and their differentiation to progenitor of cortical neurons. *PLoS ONE*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146082>

- García-López, G., García-Castro, I. L., Avila-González, D., Molina-Hernández, A., Díaz-Martínez, F., Flores-Herrera, H.,; Merchant-Larios, H. (2015). The human amniotic epithelial cells (HAEC) as a possible source of stem cells (SC). *Gaceta Medica de Mexico*, 151(1), 66–74.
- García-López, G., Ávila-González, D., García-Castro, I. L., Flores-Herrera, H., Molina-Hernández, A., Portillo, W., et al. (2019). Pluripotency markers in tissue and cultivated cells in vitro of different regions of human amniotic epithelium. *Exp. Cell Res.* 375, 31–41.
- Gittes G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Developmental biology*, 326(1), 4–35.
- Gurdon, J B (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 10. 622-40.
- Han, X., Wan, Q., Wu, W., Zheng, A., Li, L., & Liu, X. (2011). *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 28(6), 1217–1222.
- Han, Y. M., Romero, R., Kim, J.-S., Tarca, A. L., Kim, S. K., Draghici, S., et al. (2008). Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion1. *Biol. Reprod.* 79, 954–961.
- Han, X., Wan, Q., Wu, W., Zheng, A., Li, L., & Liu, X. (2011). *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 28(6), 1217–1222.
- Hao, Y., Ma, D.H., Hwang, D.G., Kim, W.S., and Zhang, F. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19, 348-352.
- Henseleit, K. D., Nelson, S. B., Kuhlbrodt, K., Hennings, J. C., Ericson, J., & Sander, M. (2005). NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, 132(13), 3139–3149.

- Hou, Y., Huang, Q., Liu, T., & Guo, L. (2008). Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(9), 830–839.
- Holland, A. M., Hale, M. A., Kagami, H., Hammer, R. E., & MacDonald, R. J. (2002). Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12236–12241.
- Hu, B Y, Weick, Jp, Yu, J, Ma, L X, Zhang, X Q, Thomson, J A, Zhang, SC (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principle but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107.4335-40.
- Huang GL, Zhang NN, Wang JS, Yao L, Zhao YJ, Wang YY.(2012) Transdifferentiation of human amniotic epithelial cells into acinar cells using a double-chamber system. *Cell Reprogram*;14(4):377–83.
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E.M., Pera, M., and Manuelpillai, U. (2007). Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 77, 577-588.
- Ilancheran, S., Moodley, Y., and Manuelpillai, U. (2009). Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 30, 2-10.
- Illmensee, K. and R. Young. 1979. Teratomas and chimeras. *Sci Am*, 240 (4): 120- 132.
- Jacquemin, P., Durviaux, S. M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O. D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., Rousseau, G. G., & Lemaigre, F. P. (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Molecular and cellular biology*, 20(12), 4445–4454.
- Jaenisch, R, Young, R (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and molecular reprogramming. *Cell*, 132, 567-82.

- Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., Qing, T., Sun, X., Zhang, P., Ding, M., Li, D., & Deng, H. (2007). In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell research*, 17(4), 333–344.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., & Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371(6498), 606–609.
- Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T (2003) Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 980:48–56.
- Kim, J.S., Kim, J.C., Na, B.K., Jeong, J.M., and Song, C.Y. (2000). Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 70, 329-337.
- Kim, Y. H., Larsen, H. L., Rué, P., Lemaire, L. A., Ferrer, J. and Grapin Botton, A. (2015). Cell cycle-dependent differentiation dynamics balances growth and endocrine differentiation in the pancreas. *PLoS Biol.* 13, e1002111.
- King, A.E., Paltoo, A., Kelly, R.W., Sallenave, J.M., Bocking, A.D., and Challis, J.R. (2007). Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 28, 161-169.
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazer, S., ... Baetge, E. E. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*, 26(4), 443–452.
- Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M., & Hosoya, M. (2012). Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 8(2), 274–284.
- Kuroda, T., Yasuda, S., & Sato, Y. (2013). Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36(2), 189–192.

- Lenz, M, Goetzke, R, Schenk, a, Schubert, C, Veeck, J, Hameda, H, Koschmieder, S, Zenke, M, Schuppert, and Wagner W (2015). Epigenetic biomarker to support classification in to pluripotent and non pluripotent cells. *Sci REP*, 5, 8973.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., & McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5520), 1389–1394.
- Luo, Y., Cheng, Y. W., Yu, C. Y., Liu, R. M., Zhao, Y. J., Chen, D. X., Zhong, J. J., & Xiao, J. H. (2019). Effects of hyaluronic acid on differentiation of human amniotic epithelial cells and cell-replacement therapy in type 1 diabetic mice. *Experimental cell research*, 384(2), 111642.
- Luo, H., Huang, X., Huang, F., & Liu, X. (2011). Transversal inducing differentiation of human amniotic epithelial cells into hepatocyte-like cells. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, 36(6), 525–531.
- Mamede, A. C., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C. J., & Botelho, M. F. (2012). Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and tissue research*, 349(2), 447–458.
- 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 USA*, 78, 7634-8.
- Marti M , Mulero, L. Pardo, C More ra, C, Carrio, M, Laricchia-Robbio, L, Esteban, CR and Izpisua Belmnte, JC (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 8 , 223-53.
- Malak, T.M., Ockleford, C.D., Bell, S.C., Dalgleish, R., Bright, N., and Macvicar, J. (1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14, 385-406.

- Manzar GS, Kim EM, Zavazava N. Demethylation of induced pluripotent stem cells from type 1 diabetic patients enhances differentiation into functional pancreatic β cells. *J Biol Chem*. 2017 Aug 25;292(34):14066-14079.
- Mayer-Davis, E. J., Kahkoska, A. R., Jefferies, C., Dabelea, D., Balde, N., Gong, C. X., Craig, M. E. (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 19(June), 7–19.
- McCracken KW & Wells JM. (2012). Molecular pathways controlling pancreas induction. *Semin. Cell Dev. Biol* 23, 656–662.
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B., and Strom, S.C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23, 1549-1559.
- Miki, T., and Strom, S.C. (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2, 133-142.
- 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;75:91-96.
- Miki, T. (2018). Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(4), 1–10.
- Muller, FJ, Schuld, B M, Williams, R, Mason, D, Altun, G, Papapetrou, E P, Danner, S, Goldmann, J E, Herbst, A, Schmidt, N O, Aldenhoff, J B, Laurent, L C, and Loring J F (2011). A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods*, 8, 315-7.
- Ni, J., Abrahamson, M., Zhang, M., Fernandez, M.A., Grubb, A., Su, J., Yu, G.L., Li, Y., Parmelee, D., Xing, L., et al. (1997). Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 272, 10853-10858.

- Niknejad, H., Peirovi, H., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., & Jorjani, M. (2010). Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *European cells & materials*, 19, 22–29.
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L., & Wright, C. V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development (Cambridge, England)*, 122(3), 983–995.
- Okere B, Alviano F, Costa R, Quaglino D, Ricci F, Dominici M, et al (2009). In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids. *Int J Immunopathol Pharmacol*;28(3):390–402.
- O’Conor, MD, Kardel, MD Iosfina, I, Youssef D, Lu M, li MM, Vercaueren S, Nagy, A Eaves CJ, 2008. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicators of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 1109-16.
- Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA (2014) Generation of functional human pancreatic b cells in vitro. *Cell* 159: 428 – 439.
- Pan, F. C., & Brissova, M. (2014). Pancreas development in humans. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 21(2), 77–82.
- Peng L, Wang J, Lu G. (2014) Involvement of gene methylation changes in the differentiation of human amniotic epithelial cells into islet-like cell clusters *DNA Cell Biol*;33(9):591–8.
- Rezania A, Bruin JE, Xu J, Narayan K, Fox JK, O’Neil JJ, Kieffer TJ. (2013) Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells*. Nov;31(11):2432-42.

- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32(11), 1121–1133.
- Russ HA, Efrat S (2011) In-vivo functional assessment of engineered human insulin producing cells. In *Cell Transplantation*, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Fox IJ (eds.), *Methods in Bioengineering*, Yarmush ML, Langer RS (eds.), pp. 35 – 46. Norwood, MA: Artech House.
- Schaffer, A. E., Freude, K. K., Nelson, S. B., & Sander, M. (2010). Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Developmental cell*, 18(6), 1022–1029.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., & German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, 127(24), 5533–5540.
- Schulz, T. C., Young, H. Y., Agulnick, A. D., Babin, M. J., Baetge, E. E., Bang, A. G., Bhoumik, A., Cepa, I., Cesario, R. M., Haakmeester, C., Kadoya, K., Kelly, J. R., Kerr, J., Martinson, L. A., McLean, A. B., Moorman, M. A., Payne, J. K., Richardson, M., Ross, K. G., Sherrer, E. S., ... Robins, A. J. (2012). A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS one*, 7(5), e37004.
- Slack J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1569–1580.
- Serra M, Marongiu M, Contini A, Miki T, Cadoni E, Laconi E, et al. Evidence of amniotic epithelial cell differentiation toward hepatic sinusoidal endothelial cells. *Cell Transplant*. 2018;27(1):23–30.
- Shahbazi, M. N., 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-organisation of human embryo in the absence of maternal tissues". *Nat Cell Biol.* 18 (6): 700-708.

- Shahjalal, H. M., Abdal Dayem, A., Lim, K. M., Jeon, T. II, & Cho, S. G. (2018). Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: Advances and challenges. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1).
- Shao, Y., Taniguchi, K., Townshend, R. F., Miki, T., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2017). A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development. *Nature communications*, 8(1), 208.
- Shapiro, A. M. J. (2011). State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Current Diabetes Reports*, 11(5), 345–354.
- Shapiro, A. M. J., Ricordi, C., Hering, B. J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R. P., Lakey, J. R. T. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *New England Journal of Medicine*, 355(13), 1318.
- Shim, J. H., Kim, S. E., Woo, D. H., Kim, S. K., Oh, C. H., McKay, R., & Kim, J. H. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia*, 50(6), 1228–1238.
- Shevde, N. (2012). Stem Cells: Flexible friends. *Nature*, 484 (7387): S22-26. · Slack JM (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569– 1580
- Slack, J M, (2000). Stem Cells in epithelial tissues, *Science*, 287, 1431-3.
- Solís, K. H., Méndez, L. I., García-López, G., Díaz, N. F., Portillo, W., Nova Ocampo, M. De, & Molina-Hernández, A. (2017). The histamine h1 receptor participates in the increased dorsal telencephalic neurogenesis in embryos from diabetic rats. *Frontiers in Neuroscience*, 11(DEC), 1–14.
- Stanger BZ & Hebrok M (2013). Control of cell identity in pancreas development and regeneration. *Gastroenterology* 144, 1170–1179.
- Stevens, L C & Little, C C 1954. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1080-7.

- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., & Habener, J. F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature genetics*, 15(1), 106–110.
- Szot G L, Koudria Pavel Bluestone J A, (2007). Transplantation of pancreatic Islets in to the kidney capsule of diabetic mice. *Jove* , Vis Exp. (9) e404.
- Szukiewicz, D., Pyzlak, M., Stangret, A., Rongies, W., & Maslinska, D. (2010). Decrease in expression of histamine H2 receptors by human amniotic epithelial cells during differentiation into pancreatic beta-like cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 59 Suppl 2, S205–S207.
- Takahashi, K and Yamanaka, S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factor. *Cell*, 126, 663-76.
- Tamagawa, T., Ishiwata, I., and Saito, S. (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, 125-130.
- Taylor, B. L., Liu, F. F., & Sander, M. (2013). Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell reports*, 4(6), 1262–1275.
- Thomson J A, Kalishman, J, Golos, T G, Durning, M, Harris, C P, Becker, R A Hearn, J P (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 78448. 1995;
- Thomson J A, Kalishman, J, Golos, T G, Durning, M, Harris, C P, Becker, R A Hearn, J P (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix JACCHUS*)blastocysts. *Biol Reprod*, 55, 254-9.
- Thomson, J A, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, S S, Waknitz, M A, Swiergiel, J J, Marshall, V S Jones, J M, (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282, 1145-7.

- Velazco-Cruz, L., Song, J., Maxwell, K. G., Goedegebuure, M. M., Augsornworawat, P., Hogrebe, N. J., & Millman, J. R. (2019). Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports*, 12(2), 351–365.
- van Herendael, B. J., Oberti, C., & Brosens, I. (1978). Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 131(8), 872–880.
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International journal of medical sciences*, 15(1), 36–45.
- Weidinger A, Poženeš L, Wolbank S, Banerjee A. Sub-Regional Differences of the Human Amniotic Membrane and Their Potential Impact on Tissue Regeneration Application. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jan 13;8:613804.
- Wang J, Peng L, Lu GX. (2011) Stem cell characteristics and islet differentiation potential of human amniotic epithelial cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue*;31(9):1484–7.39.
- Wei, J. P., Zhang, T. S., Kawa, S., Aizawa, T., Ota, M., Akaike, T., ... Nikaido, T. (2003). Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin induced diabetic mice. *Cell Transplantation*, 12(5), 545–552.
- Wu J, Okamura, D, Li, M, Suzuki, K, Luo, C, M A, L, HE, Y. Li Z, Benner, C, Tamura, I, Krause, M N, Nery, J R, Du, T, Zhang, Z, Hishida, T, Takahashi Y Aizawa E, KlM N Y, Lajara J, Guillen, P Campistol, J M, Esteban, Cr Ross, P J, Saghatelian, a Ren B, Ecker, JR izpisua Belmonte, J C, (2015). An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature*, 521, 316-21.
- Yabe, S. G., Fukuda, S., Takeda, F., Nashiro, K., Shimoda, M., & Okochi, H. (2017). Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. *Journal of diabetes*, 9(2), 168–179.

- Yoon, H. H., Jae-II-Ahn, Lee, S. K., Song, K. Y., and Park, J. K. (2014). Amniotic epithelial cells have different in vitro proliferation capacity depending on their anatomical origin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 1091–1096.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., & Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell research*, 19(4), 429–438.
- Zhang, H., Ables, E. T., Pope, C. F., Washington, M. K., Hipkens, S., Means, A. L., Path, G., Seufert, J., Costa, R. H., Leiter, A. B., Magnuson, M. A., & Gannon, M. (2009). Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mechanisms of development*, 126(11-12), 958–973.
- Zhang, P, Andrianakos, R, Yang, Y, Lui, C and Lu, W (2010). Kruppel-like factor (KLF4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J. Biol Chem*, 285, 9180-9.
- Zhang Q, Lai D. (2020) Application of human amniotic epithelial cells in regenerative medicine: a systematic review. *Stem Cell Res Ther.* Oct 15;11(1):439.
- Zhao YJ, Fang N, Chen DX, Yu LM, Yu HF, Zhao CH. (2012) Study on inducing differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin secreting cells in vitro. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*;28(2):139–43.
- Zheng, Y., Xue, X., Shao, Y., Wang, S., Esfahani, S. N., Li, Z., Muncie, J. M., Lakins, J. N., Weaver, V. M., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2019). Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. *Nature*, 573(7774), 421–425.
- Zhou J, Yu G, Cao C, Pang J, Chen X.(2011) Bone morphogenetic protein-7 promotes chondrogenesis in human amniotic epithelial cells. *Int Orthop.*35(6):941–8.
- Zhou Q, and Melton D A. (2018). Pancreas regeneration. *Nat.* 555(7705): 352-358.
- Zou G, Liu T, Guo L, Huang Y, Feng Y, Duan T (2018). MicroRNA-32 silences WWP2 expression to maintain the pluripotency of human amniotic epithelial stem cells and β islet-like cell differentiation. *Int J Mol Med* ;41:1983-91.