

Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica

Carmen L Insausti,* Miguel Blanquer,* María J Majado,* Alfredo Insausti,** José M Moraleda*,***

RESUMEN

Desde los primeros estudios de células madre obtenidas de la membrana amniótica se ha avanzado mucho en el conocimiento de las características de estas células, sus métodos de obtención y procesamiento, así como de su potencialidad. Numerosos ensayos preclínicos sugieren que las células madre de la membrana amniótica podrían ser útiles en la regeneración de una serie de alteraciones tisulares. Está por dilucidarse si el efecto benéfico que ejercen estas células se debe a su diferenciación por células del tejido afectado, o si es mediado por su acción paracrina antiinflamatoria en los tejidos del huésped, hipótesis que parece ser la más favorecida. Se requiere una estrecha colaboración entre la investigación básica y los clínicos para que la terapia con células se haga realidad en la práctica diaria.

Palabras clave: membrana amniótica, células madre, células de la membrana amniótica, células epiteliales, células mesenquimales, terapia celular.

ABSTRACT

Since the first studies on amniotic-derived stem cells were published, much knowledge has been gained regarding the characteristics, handling methods and potential of these cells. A lot of preclinical evidence suggests that human amniotic derived cells may be useful for treating a range of pathologic conditions, joining the list of significant contributors to regenerative medicine. Whether the beneficial effects of amniotic derived cells are due to differentiation of the transplanted cells themselves or to paracrine actions on the surrounding host tissue in order to reduce inflammation and promote regeneration remains to be fully elucidated. In making new cell therapy-based strategies a clinical reality, it is fundamental a close collaboration between basic scientists and clinicians.

Key words: Amnion, amniotic membrane, stem cell, amniotic epithelial stem cell, amniotic mesenchymal stem cell, Cell therapy.

La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta. Conjuntamente con el corion se extiende más allá de los márgenes del disco placentario para envolver al feto en la cavidad amniótica, brindarle protección durante su desarrollo y ofrecerle un ambiente

de suspensión en el que pueda crecer sin distorsión por presión de las estructuras que lo rodean. Interviene, además, en el intercambio de gases y desechos, y actúa como barrera de defensa contra infecciones, traumatismos y toxinas.^{1,2}

La membrana amniótica a término tiene una superficie de 700 a 1,800 cm², peso de 15 a 35 g y espesor de 70 a 180 µm. Estructuralmente está compuesta por: epitelio, lámina basal, estroma de tejido conectivo avascular, denominado mesodermo amniótico, y capa esponjosa que la separa del corion.¹⁻⁴ El epitelio amniótico forma un tapizado simple, continuo, ininterrumpido de células cilíndricas, cuboides o planas, en contacto con el líquido amniótico. Reposa sobre la lámina basal bien definida, formada por una malla de fibras de colágenos tipo III y IV y glicoproteínas. Esta lámina está conectada con el mesodermo amniótico, en cuya parte más proximal se distingue una capa compacta, acelular, compuesta de fibronectina, colágeno intersticial tipo I y III dispuestos en forma de haces paralelos, y co-

* Servicio de Hematología y Hemoterapia. Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

** Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario La Paz, Madrid.

*** Universidad de Murcia. Murcia, Madrid.

Correspondencia: Dra. Carmen L Insausti. Servicio de Hematología y Hemoterapia, Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid-Cartagena. El Palmar 30120, Murcia. Correo electrónico: caymed@gmail.com
Recibido: octubre 2011. Aceptado: noviembre 2011.

Este artículo debe citarse como: Insausti CL, Blanquer M, Majado MJ, Insausti A, Moraleda JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. Rev Hematol Mex 2011;12(4):276-286.

lágono tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre el colágeno intersticial y la membrana basal. Por fuera de ésta se encuentra una capa dispersa de células estromales de tipo fibroblastos, embebidos en una malla de fibras reticulares. Más externamente se encuentra la capa intermedia o esponjosa rica en elastina, proteoglicanos, glicoproteínas y fibras de colágeno, predominantemente tipo III, organizadas laxamente, que separa el amnios del corion.^{3,4} El amnios es uno de los pocos tejidos que carece de nervios, músculos y vasos linfáticos. Sus nutrientes son suplidos directamente por difusión desde el líquido amniótico o desde la decidua subyacente.

En los últimos años la membrana amniótica ha despertado gran interés en la comunidad científica como una fuente alternativa de células madre. En ella se ha demostrado la existencia de dos poblaciones celulares con características de células madre: las células epiteliales conocidas como hAEC: *human Amniotic Epithelial cells*, con características muy parecidas a las de las células embrionarias que, al igual que ellas, expresan marcadores antigénicos embrionarios, factores de transcripción propios de pluripotencialidad y evidencian diferenciación pluripotencial hacia células de las tres capas germinales: ectodermo (neuronas, y células gliales), endodermo (hepatocitos, células pancreáticas) y mesodermo (osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, miocitos esqueléticos), bajo condiciones de cultivo adecuadas.⁵⁻¹¹ Y las células mesenquimales obtenidas del estroma mesodérmico, denominadas hAMSC (*human Amniotic Mesenchymal Stem or Stromal cells*) que básicamente son células multipotenciales, aunque algunos investigadores también han demostrado una capacidad de diferenciación más allá de la línea mesodérmica.¹¹⁻¹⁹

Estas células, de muy fácil obtención en cantidades abundantes, a partir de un tejido de desecho de disponibilidad casi ilimitada, han resultado muy atractivas para la investigación debido a que poseen un potencial proliferativo aparentemente mayor que el de las células de la MO y evidencian, fácilmente, su potencial de diferenciación *in vitro* cuando se utilizan los medios de cultivo adecuados.¹⁵ Además, secretan neurotransmisores y factores tróficos que estimulan a las células madre endógenas y modulan positivamente el microambiente de los tejidos receptores donde han sido aplicadas, ayudando a su regeneración; sintetizan y liberan sustancias biológicamente activas como citocinas y moléculas de señalización como el TNF

(*Tumor Necrosis Factor*), TGF α , TGF β (*Transforming growth factor α and β*), bFGF (*basic fibroblastic growth factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), HGF (*Hepatic growth factor*), KGF (*Keratinocytes growth factor*), IL-4, IL-6, IL-8 (interleucinas 4, 6, 8), inhibidores naturales de metalo-proteasa, defensinas β , prostraglandinas, etc., que la capacitan para cumplir otras funciones biológicas.²⁰⁻²⁴ No expresan antígenos HLA DR, ni moléculas co-estimuladoras y juegan un papel importante en la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias; expresan antígenos HLA-G, considerados clave en la inmunotolerancia al feto, pues se comportan como péptidos tolerogénicos y contribuyen con el efecto inmunomodulador por su unión a receptores inhibitorios presentes en las células NK y en los macrófagos, inhiben la proliferación de las células T CD4+, e inducen apoptosis de las células T CD8+.^{25,26} Todas estas son ventajas adicionales sobre otros tipos de células madre, de gran importancia en la terapia celular y en la ingeniería tisular.

Usos de las hAEC y hAMSC en modelos animales

Hace poco se publicaron diferentes ensayos pre-clínicos en modelos animales con diversas enfermedades, que evidencian la habilidad de estas células para injertarse en los tejidos del huésped y contribuir a su regeneración (Cuadro 1). Algunos de ellos los comentaremos enseguida.

Enfermedades neurológicas

En el año 2000 Kakishita y colaboradores²⁷ con el uso de un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas injertaron hAEC transfectadas con el marcador LacZ del gen de β -galactosidasa (β -gal) en el striatum denervado de dopamina. Las células infundidas fueron capaces de sobrevivir, produciendo mejoría parcial durante dos semanas tras el trasplante. En una extensión del estudio realizado en 2003, los mismos investigadores demostraron que las hAEC fueron capaces de sintetizar y secretar catecolaminas y factores neurotróficos difusibles (BDNF: *Brain derived neurotrophic factor* y NT-3: *Neurotrophin-3*) que mejoraron la función y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.²⁸

En 2008, Kong y sus colaboradores²⁹ ratificaron el efecto neuroprotector y neurogénico de las hAEC trasplantadas al striatum de ratones con enfermedad de Parkinson, al observar mejoría en la conducta de los ratones trasplantados.

Cuadro 1. Trasplante de HAEC o HAMSC en modelos animales de enfermedades

Enfermedad	Animal	Evolución	Referencias
Enfermedad de Parkinson	Rata	Supervivencia celular. Síntesis y secreción de catecolaminas y factores neutróficos. Mejoría de la función y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.	27,28,
	Ratón	Efecto neuroprotector y neurogénico.	29
	Rata	Mejoría clínica. Expresión de marcadores neurales	30
Contusión del cordón medular	Mono	Supervivencia celular. Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Integración celular sin reacción inmunitaria	31
	Rata	Supervivencia celular. Expresión de marcadores neuronales. Disminución del área infartada. Mejoría clínica	32
Obstrucción arterial cerebral media	Rata	Integración en tejido hepático. Expresión de marcadores hepáticos.	33
	Ratón	Integración hepática. Expresión de receptores.	
Tejido hepático	Conejo	Integración en tejido hepático. Disminución de la apoptosis, la inflamación y la fibrosis	5,35,37,39
	Ratón	Supervivencia celular. Expresión de marcadores cardíacos. Mejoría de la función cardíaca.	36
Fibrosis hepática	Rata	Corrección de hiperglucemia. Integración celular en el hígado y el páncreas	40
Infarto cardíaco	Ratón	Disminución de la infiltración por neutrófilos. Reducción de la fibrosis.	41,42
Diabetes	Ratón	Producción de proteínas surfactantes A, B, C y D.	44
Fibrosis pulmonar	Ratón	Expresión de genes, receptores, colágeno tipo II y aggrecan	45,46
Tejido cartilaginoso	Rata	Localización en la región supra-limbal, región supra-espinal en la <i>scala vestibuli</i> y en la región subcentral del ligamento espiral en la <i>scala timpani</i> .	18
Enfermedades del oído			
Pared abdominal	Cobayo	Supervivencia durante 3 semanas. Expresión de marcadores.	47
	Rata	Integración celular. Mejoría de cicatrización. Reducción de la incidencia y tamaño de hernias incisionales.	48
Isquemia de extremidades	Ratón	Mejoría de flujo sanguíneo. Disminución de necrosis. Aumento de capilares	49

En el año 2009 Yang X y su grupo³⁰ trasplantaron hAEC al ventrículo lateral de ratas con un modelo de enfermedad de Parkinson inducido por microinyección estereotáctica de 6 hydroxydopamina (6-OHDA) en el striatum, y evaluaron la supervivencia y diferenciación de las hAEC, así como los efectos producidos por el injerto. Observaron que la rotación asimétrica inducida por la apomorfina en las ratas con enfermedad de Parkinson disminuyó significativamente a las dos semanas del trasplante en el grupo tratado; que las células injertadas expresaron nestina y vimentina a las cinco semanas del trasplante; que las células tiroxina hidroxilasa positivas detectadas por inmunohistoquímica en la sustancia nigra del grupo tratado aumentaron significativamente en relación con el grupo no tratado, y que la dopamina, las concentraciones de DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid: Ácido 3,4 Dihidroxi fenil acético) y las de ácido homovanílico (HVA: Homovanilic acid) en el striatum del grupo tratado aumentaron significativamente en relación con el grupo no tratado.

Sankar y Muthusamy, en 2003, evaluaron la utilidad terapéutica potencial de las hAEC en un modelo de contusión de la médula espinal inducida en monos no inmunosuprimidos.³¹ Trasplantaron hAEC marcadas con colorantes dentro del área lesionada y demostraron que esas células fueron capaces de sobrevivir durante más de 120 días, sin evidencias de inflamación o rechazo, y que las pruebas de locomoción mejoraron hasta una puntuación de 19, (2 puntos menos que los animales normales). Consideraron la ausencia de formación de cicatriz glial y de reacción inmune como una prueba de que las hAEC trasplantadas ofrecieron un ambiente favorable en el que supervivieron las neuronas y crecieron los axones seccionados.

En el año 2006 Wu ZY y su grupo³² obtuvieron resultados similares en ratas con sección de la médula espinal. Las hAEC marcadas con Hoechst 33342 supervivieron durante ocho semanas y se integraron, sin reacción inmune, al cordón espinal del huésped.

En el año 2008 Liu y sus colaboradores³³ tras el trasplante de hAEC en el cerebro de ratas con obstrucción

de la arteria cerebral media, demostraron que las hAEC supervivieron y migraron al área isquémica expresando marcadores neuronales, lo que se acompañó de mejoría significativa de la disfunción conductual y de reducción del volumen del área infartada en los animales tratados con células en relación con los controles.

En el año 2009 Yu SJ y sus coautores³⁴ realizaron una revisión acerca del uso de la membrana amniótica como fuente de células para la terapia celular en ictus, una enfermedad en la que la inflamación es el contribuyente principal de la cascada de muerte celular secundaria que sigue al episodio inicial de ictus y en la que las células trasplantadas podrían controlar los efectos deletéreos de la inflamación y evitar la progresión del ictus. Concluyeron, con base en los artículos revisados, que las hAEC ejercen un efecto neuroprotector en las fases agudas del daño y facilitan la neuroregeneración en las fases tardías. Además, que el factor 1 liberado desde el estroma durante la inflamación sirve para guiar a las células trasplantadas hacia el tejido isquémico; por ello resulta efectiva la administración de las hAEC por vía periférica en la fase aguda del ictus.

Enfermedades hepáticas

Sakuragawa y su grupo,³⁵ en el año 2000, en un estudio con hAEC transducidas con el gen de la β gal, trasplantadas en el hígado de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (IDSC), observaron integración hepática de las células trasplantadas y positividad para α -fetoproteína y albúmina en las semanas 1 y 2 enseguida de la inyección. Plantearon que las hAEC podrían ser útiles como portadores de genes para pacientes con enfermedades hepáticas congénitas.

Takahashi S y sus colaboradores,³⁶ en 2001, lograron la expresión de un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR: *Low density lipoprotein receptor*) en las hAEC a través de la recombinación con adenovirus y trasplantaron dichas células genéticamente modificadas en el hígado de conejos con un modelo de hipercolesterolemia familiar. Observaron una disminución importante del colesterol sérico, así como la migración de las células desde los sinusoides hacia el parénquima hepático, con expresión de los receptores durante 20 días tras el trasplante, después de esto las células desaparecieron. Atribuyeron la temporalidad de la respuesta al rechazo del xeno-injerto y a la función transitoria del vector adenovirus.

Takahashi N y su grupo,³⁷ en 2002, trasplantaron hAEC transfectadas con el adenovirus AdlacZ en el hígado de ratas fetales por manipulación uterina y evidenciaron que las células trasplantadas formaron una masa celular que tuvo una supervivencia mayor de 14 días tras el nacimiento de los fetos. Plantearon que el uso de las hAEC como transportador de genes podría resultar en la expresión a largo plazo de genes exógenos.

Takashima S y sus colegas,³⁸ en el año 2004, trasplantaron piezas de amnios en la cavidad peritoneal de ratones con IDSC y evaluaron la supervivencia del tejido y la secreción de albúmina. Detectaron que el amnios tuvo una duración de dos semanas con habilidad metabolizante medida por MTT y que tanto en el suero como en el líquido peritoneal se observó producción de albúmina humana durante siete días tras el trasplante. Los autores plantearon que aún cuando el trasplante de amnios o de las hAEC podía ser una estrategia terapéutica novedosa para enfermedades hepáticas, uno de los problemas a resolver es la corta supervivencia del tejido trasplantado.

En los años 2005 y 2009 el grupo de Miki^{5,39} presentó evidencias adicionales de que las hAEC son capaces de realizar funciones hepáticas, al detectar en el suero de los ratones con IDSC trasplantados con hAEC α 1-antitripsina humana.

En el año 2010 Manuelpillai y sus colaboradores,⁴⁰ en un modelo de fibrosis hepática en ratones inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl_4), trasplantaron hAEC. A las dos semanas de la infusión observaron las hAEC en el hígado de los ratones, sin evidencias de rechazo, así como albúmina humana en el suero de dichos ratones. Además, tras el trasplante observaron disminución en el grado de apoptosis de los hepatocitos y, reducción de la inflamación y la fibrosis en comparación con los animales controles.

Enfermedades cardíacas

Zhao y su grupo,⁴¹ en el año 2005, demostraron que las hAMSC xeno-trasplantadas en el miocardio infartado de ratas tuvieron supervivieron al menos dos meses y se diferenciaron en células parecidas a cardiomiocitos, quizá por efecto de algunos factores endógenos. En el ensayo de diferenciación cardiomiocítica realizado por los citados autores, el cocultivo con explantes de corazón de ratas neonatales confirmó que un pequeño número de hAMSC marcado con el colorante fluorescente PKH67

fue capaz de integrarse y diferenciarse en células parecidas a cardiomiocitos. Consistente con este hallazgo, la evaluación por microscopia de fluorescencia de las hAMSC marcadas con el colorante fluorescente PKH67 e inyectadas en el miocardio infartado de las ratas, permitió detectar esas células en cortes congelados realizados a las 4 y 8 semanas, lo que se ratificó por PCR, a través de la expresión de genes humanos en el corazón de las ratas, usando sondas de β_2 microglobulina específica humana. Además, las hAMSC marcadas con PKH67 y trasplantadas resultaron positivas para el péptido natriurético (ANP) y para la cadena pesada β de miosina (β -MHC) cuando se evaluaron por inmunofluorescencia. Aunque, a diferencia de lo observado en los cardiomiocitos derivados de ESC y de las MSC de la MO, en estos las propiedades funcionales electrofisiológicas no se demostraron. Los autores consideran que los datos obtenidos son suficientes para sustentar la capacidad potencial de estas células y sus probables usos clínicos.

Ventura y su grupo,⁴² en el año 2007, demostraron mejoría de la función cardíaca durante cuatro semanas tras la inyección intramiocárdica de células derivadas de la membrana amniótica en corazones de ratas infartadas.

En el año 2009 Cargnoni y colaboradores⁴³ demostraron que el uso de fragmentos de membrana amniótica aplicados en el ventrículo izquierdo isquémico de ratas a las que se les había practicado ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, produjo mejoría de la función cardíaca y reducción de la zona de infarto evaluada por ecocardiografía, parámetros cardíacos funcionales y morfológicos. La mejoría fue aparente a los siete días de la aplicación y persistió por al menos tres meses. Los autores no observaron injerto de las células de la membrana amniótica en el tejido cardíaco del huésped, con lo que plantearon la hipótesis, también sugerida por otros, de que el efecto benéfico se debe a la secreción paracrina por las células de la membrana amniótica de factores solubles cardio-protectores que promueven la regeneración del tejido del huésped.

Enfermedades pancreáticas

En 2003 Wei y su grupo⁴⁴ cultivaron hAEC durante 2 a 4 semanas en presencia de nicotinamida para inducir diferenciación pancreática. El trasplante subsecuente de las hAEC productoras de insulina corrigió la hiperglucemia de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina durante

varias semanas. Además, al analizar la distribución de las células humanas y de la secreción de insulina con anti β_2 microglobulina y anti-insulina humanas con técnicas de inmunohistoquímica demostraron su localización en los sitios anatómicos de producción de insulina (hígado y páncreas) del ratón. El proceso fue reversible en 20% de los ratones lo que se atribuyó, en parte, a la vida media del grupo celular implantado.

Enfermedades pulmonares

Cargnoni y sus colaboradores,⁴⁵ en el año 2009, estudiaron los efectos de las células (epiteliales y mesenquimales) derivadas de membrana amniótica humana y de membrana amniótica de ratón en un modelo de fibrosis pulmonar inducida en ratones por instilación intratraqueal de bleomicina. Las células de la membrana amniótica se infundieron 15 min después de la bleomicina vía intratraqueal o intraperitoneal en los casos xenogénicos, e intravenosa en los casos alógenicos. Las células trasplantadas se detectaron a los 3, 7, 9 y 14 días del trasplante y concomitantemente se observó una clara disminución en la infiltración por neutrófilos y reducción importante en la severidad de la fibrosis pulmonar en los ratones tratados con células de membrana amniótica, independientemente de la fuente (xenogénica o alógena), o de la vía de administración. Los autores plantean que la reducción de la infiltración por neutrófilos podría ser mediada vía secreción de factores solubles antiinflamatorios liberados por las células.

En 2010 Moodley y sus colegas⁴⁶ demostraron que la administración intravenosa de hAEC en un modelo de daño pulmonar producido en ratones con IDSC condujo al injerto precoz de las células y a la producción de proteínas surfactantes A, B, C y D.

Enfermedades del cartilago

Wei y su grupo,¹⁸ en el año 2009, demostraron que las hAMSC colocadas en cámaras de difusión con inductores condrogénicos (proteína morfogénica recombinante humana: rHuBMP-2) y trasplantadas en tejidos no cartilagosos (espacio sub-facial del músculo abdominal) de ratones, o implantadas sobre defectos cartilagosos generados en los cóndilos femorales mediales de ratas inmunodeficientes de ocho semanas de edad, experimentaron cambios morfológicos con depósito de colágeno tipo II en el citoplasma y en la matriz pericelular.

Enfermedades del oído

En el año 2004 Yuge y sus coautores⁴⁷ estudiaron la posibilidad de usar hAEC para el tratamiento de la pérdida de la audición. Las hAEC cultivadas *in vitro* expresaron conexina 26 (Cx26) en la membrana celular y en el núcleo, y ATPasa de Na⁺ y K⁺ en la membrana celular y en el citoplasma, los que normalmente son expresados en los fibrocitos cocleares, encargados de mantener la homeostasis local de los iones que, a su vez, es sumamente importante para la audición. Utilizando una técnica de transferencia de colorante amarillo Lucifer para evaluar la comunicación intercelular a través de las uniones gap, evidenciaron la capacidad de comunicación entre célula y célula en las hAEC cultivadas. Las hAEC trasplantadas *in vivo* en la cóclea de cobayos se localizaron predominantemente en la región supra-limbal, región supra-espiral en la *scala vestibuli* y en la región subcentral del ligamento espiral en la *scala timpani*, que es una de las cavidades del laberinto coclear. Dichas células pudieron sobrevivir por al menos tres semanas. Las hAEC actuaron como células parecidas a fibrocitos funcionales, aunque no está claro, si las características de las células trasplantadas fueron el resultado de trans-diferenciación o fusión celular. Los hallazgos sugieren que el trasplante de hAEC podría ser una estrategia terapéutica para diferentes enfermedades del oído interno.

Regeneración del músculo esquelético

En el año 2007 Xing y su grupo⁴⁸ inyectaron células amnióticas multipotentes humanas (AMP: *Amniotic multipotent cells*), obtenidas comercialmente, en la pared abdominal de la rata (sitio de mayor carga) previo a la laparotomía, con el objeto de incrementar la recuperación de la fuerza en los músculos de la pared abdominal y disminuir la incidencia de hernias incisionales. Tras la laparotomía, midieron las propiedades mecánicas de la herida y la incidencia y severidad del fracaso en la cicatrización durante 28 días. Los investigadores observaron que las células fueron viables durante al menos 28 días y no migraron a otros sitios, que la pérdida de fuerza por la laparotomía mejoró a los siete días del posoperatorio tras la terapia con las células AMP y que dicha terapia mejoró la cicatrización y redujo la incidencia y el tamaño de hernias incisionales. Según los autores todo se debió a la diferenciación de las AMP hacia células parecidas a fibroblastos, o a la producción de citocinas: TGF-β2, bFGF, and GM-CSF.

Enfermedades vasculares

En el año 2009 Prather y su grupo⁴⁹ investigaron el uso de células estromales derivadas de la placenta humana, expandidas en 3D, denominadas PLX-PAD, en el tratamiento de la isquemia crítica de extremidades inducida en ratones. Las células se inyectaron vía intramuscular cinco horas tras la producción de la isquemia y observaron que durante 21 a 28 días el flujo sanguíneo en la extremidad isquémica fue significativamente mayor y la tasa de necrosis celular significativamente menor en los ratones tratados que en los no tratados. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron un aumento significativo en el número de nuevos capilares en la extremidad de los animales tratados, así como niveles disminuidos de nitrotirosina, un indicador de estrés oxidativo, y de VCAM-1, un indicador de inflamación endotelial. Todo ello, sin ningún efecto adverso. Basados en estos resultados, PLX-PAD se está evaluando en un ensayo clínico en isquemia crítica de extremidades en Estados Unidos y en la Unión Europea.

A pesar de que sólo algunos de los ensayos revisados aportan pruebas acerca de la diferenciación *in vivo* de las células de la membrana amniótica hacia las líneas celulares investigadas^{18,33,41} y que ninguno señala una recuperación sostenida de la afectación que se ha pretendido corregir, todos coinciden en señalar que dichas células producen mejoría funcional y efectos benéficos a través de efectos tróficos directos o sobre las células del huésped, efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, producción de citocinas, disminución de la apoptosis, estimulación de la angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis, oligodendrogénesis, etc.^{27,28,29,40,43,45,48}

Uso de las hAEC y hAMSC en humanos

A pesar de los datos prometedores que hemos comentado, un aspecto importante para el uso clínico de las células madre de la membrana amniótica es el relacionado con la seguridad de dichas células una vez que se han trasplantado en un paciente. En este sentido, podría ser de utilidad señalar que la membrana amniótica se ha utilizado en clínica prácticamente durante un siglo para tratar diversas enfermedades.

Según la bibliografía, Davis y su grupo fueron los primeros en utilizar las membranas fetales (amnios y corion) en clínica, específicamente en el trasplante de piel.⁵⁰ A partir de ellos se utilizó para el tratamiento de quemaduras, heridas de diferentes etiologías, úlceras cutáneas,

como tejido de apoyo para la reconstitución quirúrgica de diversos órganos (lengua, boca, tímpano, mucosa nasal, vejiga, uretra, vagina, superficie articular, etc.), como sustituto del peritoneo en procedimientos exenterativos y reconstructivos pélvicos, en la prevención de sinequias o adherencias en cirugía pélvica y abdominal, como recubrimiento biológico de onfaloceles, en la reconstitución de tendones, etc.,^{51,52} así como para diversas patologías oftalmológicas.⁵³⁻⁵⁷

En Oftalmología su empleo fue señalado por primera vez en 1940 por De Rotth quien utilizó las membranas fetales en la superficie ocular como un apósito biológico para el tratamiento de defectos conjuntivales.⁵³ Más tarde, Sorby y su grupo utilizaron la membrana amniótica preservada, como recubrimiento temporal en el tratamiento de lesiones oculares cáusticas agudas.⁵⁴ Con esta técnica lograron resultados favorables; sin embargo, por razones poco claras su uso fue abandonado o no fue publicado durante aproximadamente cinco décadas. En 1995 con los ensayos de reconstitución con membrana amniótica de las córneas de conejos con defectos limbicos, realizados por Kim JC y Tseng renace un interés generalizado por el uso de la membrana amniótica en oftalmología.⁵

Hace poco aparecieron numerosos artículos publicados de su eficacia en distintas patologías de la superficie ocular: queratopatías,⁵⁹ fenilcetonuria,⁶⁰ enfermedad conjuntival de Bowen,⁶¹ para prevenir la neo-vascularización corneal,⁵⁶ en afecciones del epitelio corneal⁶²⁻⁶⁷ y en el tratamiento de las úlceras tróficas persistentes de la córnea.⁶⁷⁻⁷⁰ De la misma manera, la membrana amniótica ha sido efectiva para el tratamiento de quemaduras cutáneas y úlceras crónicas de diversas causas, con resultados que han demostrado que su aplicación es bien tolerada y que favorece la epitelización de los tejidos dañados.⁷¹⁻⁷⁴ (Cuadro 2)

Consideramos que el perfil de seguridad demostrado por la membrana amniótica en todas estas indicaciones podría servir de base para que sus células pudieran ser investigadas en ensayos clínicos fase I. En este sentido debemos señalar que en la lista de ensayos clínicos actualmente registrados en www.clinicaltrial.gov aparecen tres estudios que mencionan el empleo de células de la placenta:

1. UC-MSCs/Placenta-MSCs: Safety and Efficacy Study of Umbilical Cord/Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells to Treat Severe Aplastic Anemia. Sponsor: Shandong University. China. NCT01182662. Activo. En fase de reclutamiento de pacientes.

El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia de las MSC derivadas del cordón umbilical-placenta humana a la dosis de 1×10^6 MSC/kg en pacientes con anemia aplásica severa.

2. UC-MSCs/Placenta-MSCs: Safety and efficacy study of umbilical cord/placenta-derived mesenchymal stem cells to treat myelodysplastic syndromes. Sponsor: Shandong University. China. NCT01129739. Activo. En fase de reclutamiento de pacientes.

El propósito de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia de las MSC derivadas del cordón umbilical-placenta humana a la dosis de 1×10^6 MSC/kg en pacientes con síndromes mielodisplásicos tipo anemia refractaria (AR) y anemia refractaria con anillos sideroblásticos (ARAS).

3. Placenta-MSCs: Safety of intramuscular injection of Allogeneic PLX-PAD cells for the treatment of critical limb ischemia (CLI). Sponsor: Pluristem Ltd. NCT00919958. Activo. Todavía no está reclutando pacientes.

El propósito de este estudio es determinar la seguridad de una dosis única IM de PLX-PAD para el tratamiento de pacientes con isquemia crítica de extremidades (CLI).

PLX-PAD son células estromales “mesenchymal-like” derivadas de deciduas obtenidas de placentas humanas a término, expandidas en un biorreactor 3D propiedad de la Compañía PluriXTM.

Además, hasta donde sabemos, existe un artículo publicado en el año 2009⁷⁵ en el que se describe la utilización de MSC obtenidas de placentas humanas (sin cordón umbilical ni membranas fetales) a la dosis de 1×10^6 /kg IV (total 120×10^6), 5 horas antes de un trasplante de doble de cordón en un paciente de 20 años con leucemia aguda mieloblástica en segunda remisión completa. Las MSC de la placenta y las células del cordón procedían de donantes no relacionados. La infusión de las células se realizó en una suspensión de 30 mL en siete minutos a través de un filtro de 200 μ m. El paciente no presentó complicaciones agudas, subagudas o crónicas relacionadas con la infusión de MSC de la placenta. Los autores consideran que el procedimiento fue seguro, y que el paciente representa el primer caso de un programa de ensayos clínicos con MSC derivadas de placentas humanas.

En nuestro grupo de terapia celular, cuyo objetivo es la investigación traslacional, el estudio de membrana amniótica y la caracterización de sus células ha inspirado la realización de tres ensayos en animales actualmente

Cuadro 2. Publicaciones recientes acerca de la indicación clínica de la membrana amniótica

<i>Años</i>	<i>Títulos</i>	<i>Referencias</i>
2000	Reconstitution of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells	62
2001	Amniotic membrane graft in ocular surface disease. Prospective study with 31 cases.	68
2003	Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods.	69
2004	The Amniotic membrane in ophthalmology	55
2005	Amniotic membrane use in ophthalmology Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction.	56 64
2006	Ultrastructural analysis of in vivo expanded corneal epithelium on amniotic membrane Amniotic membrane transplantation for treatment of symblepharon in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Amniotic Membrane transplantation in palliative treatment of bullous keratopathy Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation	65 63 59 70
2007	Amniotic Membrane Transplantation Use of amniotic membrane graft and corneal transplantation in a patient with bilateral keratomalacia induced by uncontrolled phenylketonuria Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases.	57 60 71 72
2008	Amniotic membrane transplantation for the management of corneal epithelial defects: an in vivo confocal microscopic study.	66
2009	Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials	75
2010	Amniotic membrane transplantation in the treatment of persistent epithelial defect on the corneal graft. Use of amniotic membrane transplantation in isolated conjunctival Bowen disease: a case report Dried irradiated human amniotic membrane as a biological dressing for facial burns--a 7-year case series Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds.	67 61 73 74

en curso: uno, relacionado con la inducción de factor VIII tras el trasplante de hAMSC o de AMSC obtenidas de membrana amniótica de ratones sanos en un modelo murino de hemofilia A. Otro, relacionado con el trasplante intracardiaco de MSC procedentes de membrana amniótica de conejas sanas, en conejos con cardiomiopatía dilatada inducida por antraciclina, cuyo objetivo es evaluar si la inyección intracardiaca de dichas células mejora la fracción de eyección y los otros parámetros propios de la miocardiopatía dilatada. Un tercero, en el que se busca evaluar en ratones con grandes heridas cutáneas el efecto promotor de la epitelización de la membrana amniótica utilizada como apósito biológico. Además se tiene previsto iniciar un estudio del efecto inmunomodulador y antiin-

flamatorio de las células de la membrana amniótica en un modelo en ratones de enfermedad injerto contra huésped crónica. Paralelamente a estos ensayos experimentales se ha diseñado un ensayo clínico para evaluar el efecto de la membrana amniótica en la regeneración del epitelio cutáneo en pacientes con úlceras extensas postraumáticas, y se han obtenido las pruebas de concepto y las primeras experiencias en pacientes.⁷⁴

CONCLUSIÓN

Los datos expuestos indican que existen suficientes evidencias que avalan la utilidad potencial de la membrana amniótica y sus células en una amplia variedad de enfer-

medades. Consideramos que en el futuro cercano, en la medida que se optimicen las condiciones de cultivo y de expansión de dichas células para aumentar su potencial proliferativo y prolongar su vida media, así como los métodos de preservación para asegurar una conservación efectiva a largo plazo, se podrá validar su eficacia en diferentes modelos de enfermedades en animales y, con ello, desarrollar las estrategias para su producción conforme a las exigencias GMP (*Good Manufacturing Practice*), lo que en definitiva permitiría la traslación de los resultados preliminares presentados en esta revisión hacia aproximaciones terapéuticas efectivas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el ISCIII (FIS EC07/90762, RETICS RD/0010/2012, INT09/259, FIS PI071130) la DGTATX (TRA-137, EC10-023), la Fundación Diógenes y la Fundación Séneca (08859/PI/08).

REFERENCIAS

- Bourne G. The Foetal Membranes. A Review of the Anatomy of Normal Amnion and Chorion and Some Aspects of Their Function. *Postgrad Med J* 1962;38:193-201.
- Benirschke K., Kaufman P. Anatomy and Pathology of the placental membranes. In: *Pathology of the Human Placenta*. 4th ed. New York: Springer, 2000;281-334.
- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and materials* 2008; 15:88-99.
- Dobrev MP, Pereira PM, Deprest J, Zwijsen A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol* 2010;54:761-777.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz D, Strom S. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23:1549-1559.
- Miki T, Strom SC. Amnion derived pluripotent-multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006;2:133-142.
- Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, et al. Stem cell derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007;77(3):577-588.
- Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniasta P, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25:91-98.
- Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004;29:73-83.
- Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression *in vitro* from human amniotic epithelial cells. *European Cells and Materials* 2010;19:22-29.
- Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative Characterization of Cultured Human Term Amnion Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells for Application in Cell Therapy. *Cell Transplantation* 2008;17:955-968.
- Parolini O, Soncini M. Human Placenta: a source of progenitor/stem cells? *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006;3:117-126.
- Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:664-673.
- Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: Disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem cells and development* 2010;19:143-154.
- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *BMC developmental. Biology* 2007; 7:1-14.
- Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1:296-305.
- Kim J, Mi Kang H, Kim H, Ran Kim M, et al. *Ex vivo* characteristics of human amniotic membrane- derived stem cells. *Cloning and stem cells* 2007;9:581-594.
- Wei JP, Nawata M, Wakitani S, Kametani K, et al. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning and Stem Cells* 2009;11:19-25.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara G, Bilic G, et al. Concise Review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26:300-311.
- Whittle WL, Gibb W, Challis JRG. Characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta* 2000;21:394-401.
- Li H, Niederkorn J, Neelam S, Mayhew E, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:900-907.
- Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173-177.
- Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of anti-angiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348-352.
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, et al. Suppression of interleukin 1 (alpha) and interleukin 1 (beta) in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-449.
- Houlihan JM, Biro PA, Harper HM. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E y HLA-G. *J Immunol* 1995;154:5665-5674.
- Magatti M, de Munari S, Vertua E, Nassuato C, et al. Amniotic mesenchymal tissue cell inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009;18:899-914.
- Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakurawaga N. Human Amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's

- disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000;165:27-34.
28. Kakishita K, Nakao N, Sakurawaga N, Itakura T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 2003;980:48-56.
 29. Kong XY, Cai Z, Pan L, Zhang L, et al. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. *Brain Res* 2008; 1205:108-115.
 30. Yang X, Xue S, Dong W, Kong Y. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparkinsonian rats. *Chinese Medical Journal* 2009;122:2449-2454.
 31. Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003;118:1-17.
 32. Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, Wu X, Guo LH. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chin Med J (Engl)* 2006;119:2101-2107.
 33. Liu Y, Wu J, Huang Q, Hou J, et al. Human Amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008;29:603-611.
 34. Yu SJ, Soncini M, Kaneko Y, Hess DC, et al. Amnion a potent graft source for cell therapy in stroke: *Cell Transplant* 2009;18:111-118.
 35. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 2000;45:171-176.
 36. Takahashi S, Ohsugi K, Yamamoto T, Shiomi M, Sakuragawa N. A novel approach to ex vivo gene therapy for familiar hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as transgene carrier. *Tohoku J Exp Med* 2001;193:279-292.
 37. Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, Lu H, et al. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation. *Cell Transplant* 2002; 11:443-449.
 38. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004;29:73-83.
 39. Miki T, Marongiu F, Ellis EC, Dorko K, et al. Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol Biol* 2009;481:1-14.
 40. Manuelpillai I, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells reduce hepatic fibrosis in immunocompetent CCl₄-treated mice. *Cell Transplantation* 2010;19:1157-1168.
 41. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;79:528-535.
 42. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drives cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem* 2007;282:14243-14252.
 43. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, et al. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplant* 2009;18:1147-1159.
 44. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003;12:545-552.
 45. Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, et al. Transplantation of allogenic and xenogenic placenta derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009;18:405-422.
 46. Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, et al. Human amniotic epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augment repair. *Am J Respi Crit Care Med* 2010;182:643-651.
 47. Yuge I, Takumi Y, Koyabu K, Hashimoto S, et al. Transplanted human amniotic epithelial express connexin 26 y Na-K-ATPase in the inner ear. *Transplantation* 2004;77:1452-1454.
 48. Xing L, Franz MG, Marcelo CL, Smith CA, et al. Amnion-derived multipotent progenitor cells increase gain of incisional breaking strength and decrease incidence and severity of acute wound failure. *J Burns and Wounds* 2007;7:39-52.
 49. Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, et al. The role of placental derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2009;11:427-434.
 50. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the John Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910;15:307-396.
 51. Trefold JD, Treford-Sauer M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:833-845.
 52. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med Assoc* 2003;53:29-32.
 53. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940;23(5):22-525.
 54. Sorby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of eye. *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-345.
 55. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan S. The Amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 2004;49:51-77.
 56. Gomes JA, Roman A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2005;16:233-240.
 57. Baradaran-Raffi A, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA. Amniotic membrane transplantation. *Iranian J Ophthalmol Res* 2007;2:58-73.
 58. Kim JC y Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14: 473-484.
 59. Zemba M, Andrei S, Cucu B, Bratulescu M, et al. Amniotic Membrane transplantation in palliative treatment of bullous keratopathy. *Oftalmologia* 2006;50:51-53.
 60. Habot-Wilner Z, Spierer A, Barequet IS, Greenbaum A. Use of amniotic membrane graft and corneal transplantation in a patient with bilateral keratomalacia induced by uncontrolled phenylketonuria. *Cornea* 2007;26:629-631.
 61. Motolese J, Mazzera L, Frezzotti P, Motolese PA, Motolese E. Use of amniotic membrane transplantation in isolated conjunctival Bowen disease: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2010; 20:604-607.
 62. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.

63. Altan-Yaycioglu R, Akova YA, Oto S. Amniotic membrane transplantation for treatment of symblepharon in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cornea* 2006; 25:971-973.
64. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005;24:643-653.
65. Ha HS, Song KY, Kim JC. Ultrastructural analysis of in vivo expanded corneal epithelium on amniotic membrane. *J Korean Med Sci* 2006;21:544-549.
66. Nubile M, Dua HS, Evb-M Lanzini T, Carpineto P, et al. Amniotic membrane transplantation for the management of corneal epithelial defects: an in vivo confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol* 2008;92:54-60.
67. Dekaris I, Mravicic I, Barisic A, Draca N, Pauk M. Amniotic membrane transplantation in the treatment of persistent epithelial defect on the corneal graft. *Cell Antropol* 2010;34 Suppl 2:15-19.
68. Muraine M, Descargues G, Franck O, Villeroy F, et al. Amniotic membrane graft in ocular surface disease. Prospective study with 31 cases. *J Fr Ophtalmol* 2001;24:798-812.
69. Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods. *Biosci Rep* 2003;23:169-174.
70. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Fatima A, et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2006; 54:29-34.
71. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2007;15: 459-464.
72. Hasegawa T, Mizoguchi M, Haruna K, Mizuno Y, et al. Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases. *J Dermatol* 2007;34:328-332.
73. Bujang-Safawi E, Halim AS, Khoo TL, Dorai AA. Dried irradiated human amniotic membrane as a biological dressing for facial burns--a 7-year case series. *Burns* 2010;36: 876-882.
74. Insausti CL, Alcaráz A, García-Vizcaino EM, Mrowiec A, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Rep Reg* 2010;18:368-377.
75. Brooke G, Rosstti T, Pelekanos R, Ilic N, et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *British J Haematol* 2009;144:571-579.