

Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado**

Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”

**Departamento de Enfermedades Inflammatorias
Oculares**

**DESARROLLO DE UNA TECNICA DE CULTIVO
DE CELULAS CONJUNTIVALES HUMANAS.**

**TESIS DE POSGRADO
Que para obtener el grado de especialidad en**

OFTALMOLOGIA

Presenta

Dra. Iliana Minerva Peñaloza Román.

Tutores:

**Dr. Ellery Marino López Star.
Dr. Francisco Martínez Castro.
Dra. Teresa Valdéz González.
Dra. Judith Adriana Espinoza Navarro.**

Tutores externos:

**Dr. Yonathan O. Garfias Becerra
Dra. Ma. Carmen Jiménez Martínez**

México, D.F

Enero del 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Enfermedades Inflammatorias del Hospital de Nuestra Señora de la Luz y en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”. Fue dirigido por Dr. Ellery Lopez Star, Dr. Yonathan Garfias y Dra. Ma. Carmen Jiménez. Este trabajo fue apoyado por los proyectos CONACYT-SALUD 14108 y C01-71291

*A mis padres, Rosina y Rogelio,
por su amor, confianza y apoyo incondicional.*

*A mis hermanos, Abraham y Rogelio,
por el tiempo que no hemos pasado juntos.*

AGRADECIMIENTOS

Para poder realizar ésta tesis de la mejor manera posible fue necesario el apoyo de algunas personas a las cuales quiero agradecer.

En primer lugar a los doctores Judith Espinoza y Ellery López por haber compartido su idea conmigo e invitarme a participar; sin olvidar la dedicación y paciencia que les ha supuesto la supervisión de éste.

A los doctores Teresa Valdez y Francisco Martínez por sus consejos y recomendaciones siempre atinados.

No habría sido posible mi incursión en el área de investigación básica sin la dirección y el apoyo de los doctores Ma. Carmen Jiménez y Yonathan Garfias; su generosidad, entusiasmo y la creencia en el buen fin de este trabajo han sido invaluable.

A Andrés Luna por sus claras explicaciones y apoyo técnico; así como a todos los compañeros residentes que participaron en la toma de muestras.

Especialmente deseo agradecer a Ximena Mira por su amistad, apoyo, optimismo y su ayuda para aclarar las ideas.

A mis amigos residentes de tercer año, esta es la conclusión del trabajo realizado durante estos largos meses. Gracias por su amistad, apoyo y comprensión; son inigualables.

INDICE

<i>I.</i> Introducción.....	1
<i>II.</i> Objetivo.....	3
<i>III.</i> Materiales y Métodos.....	4
<i>IV.</i> Resultados.....	8
<i>V.</i> Discusión.....	13
<i>VI.</i> Conclusión.....	15
<i>VII.</i> Bibliografía.....	16

INTRODUCCION

La conjuntiva es una membrana mucosa que se adhiere a la cápsula de Tenon en su parte más anterior y se encuentra compuesta de epitelio y estroma. Tiene un papel fundamental como barrera anatómica e inmune sobre el globo ocular y permite el libre movimiento de éste. ⁽¹⁾

Tres tipos de células conforman esta estructura: 1) células epiteliales cuya morfología va desde la forma cilíndrica en el epitelio columnar estratificado en el fórnix hasta la forma plana en el epitelio escamoso estratificado limbal y áreas del borde palpebral; 2) células mucinosas secretoras; 3) fibroblastos del estroma. ⁽¹⁾

El epitelio conjuntival forma una barrera física de protección y contribuye en la formación y mantenimiento de la capa de lágrima en la superficie ocular. La conjuntiva también puede servir como un sustrato de células epiteliales para migrar y recubrir el estroma corneal como consecuencia de la pérdida del epitelio corneal. ⁽²⁾

Diversas patologías pueden afectar a la superficie ocular debido a su natural exposición al ambiente y a la manera en la que la superficie mucosa responde a las agresiones. Las secuelas de la inflamación alteran la ultraestructura de la conjuntiva, y puede afectar la diferenciación de su epitelio, produciendo de esta forma alteraciones en su superficie así como en la película lagrimal, párpados y córnea. Algunos ejemplos incluyen: quemaduras químicas, síndrome de Stevens-Johnson, tumores epiteliales, patologías inmunológicas:

rosácea ocular, penfigoide cicatricial, lesiones por radiación o excisiones quirúrgicas amplias que pueden resultar en una respuesta inflamatoria posoperatoria mas severa, cicatrización y fibrosis de la zona donadora que puede promover la formación de granuloma piógeno, o en casos severos de simblefaron, acortamiento del fórnix, restricción de la motilidad ocular y diplopia, necrosis escleral e infección. Como resultado de estos procesos la superficie ocular puede ser dañada de forma irreversible con serias consecuencias tanto para la visión como para el confort ocular. ⁽³⁻⁶⁾

Debido a lo anterior es de suma importancia la adecuada reconstrucción de la superficie ocular. Desde hace algunos años se ha incurrido a la medicina regenerativa a través de la ingeniería de tejidos como vía de desarrollo de células madre somáticas para regenerar o sustituir las estructuras biológicas. Para lograr este objetivo se requieren dos factores importantes: células madre, que tienen una alta capacidad de proliferación y diferenciación, y el sustrato que las soportará. ⁽⁷⁾

En la conjuntiva se ha observado que las células madre se encuentran localizadas a nivel del fórnix, ⁽²⁾ los explantes conjuntivales pueden contener células germinativas, o mejor aun células madre ⁽⁴⁾. Muchos estudios realizados en cultivos celulares se han enfocado en la capacidad de reconstruir un tejido equivalente en las características estructurales y funcionales al del tejido original. Esto se ha logrado al obtener la diferenciación de células mediante la modificación de su medio de cultivo y su ambiente. Sin embargo, las células diferenciadas tienen un tiempo limitado de proliferación, resultando en un bajo potencial regenerativo al realizarse el trasplante.

En décadas pasadas se han desarrollado nuevas técnicas de reconstrucción de superficie ocular como el empleo de membrana amniótica, trasplante de células madre limbaes o trasplante de mucosa oral. Tejidos conjuntivales obtenidos mediante bioingeniería pueden proveer una alternativa para la sustitución de autoinjertos y minimizar el daño iatrogénico a la superficie ocular. ^(6,9) Actualmente existe únicamente una línea de células inmortalizadas epiteliales conjuntivales disponible para su uso en investigación, la Wong-Kilbourne derivado de las células de Chang (American Type Culture Collection [CCL] 20.2 clone 1-5c-4; Manassas, VA). ⁽¹⁰⁾ Aunque otros autores han reportado el desarrollo de algunas líneas epiteliales conjuntivales; ^(6,8,11) esta técnica no ha se desarrollado en nuestro país.

Nuestro objetivo es desarrollar una técnica de cultivo celular para la expansión in Vitro de células epiteliales conjuntivales, que sea reproducible, que nos permita obtener tejido conjuntival viable no sólo para la obtención de injertos utilizados en la reparación estructural y funcional del globo ocular; así como, para realizar investigación básica en el rubro de la farmacología, la fisiología tisular y los mecanismos de lesión o inflamación.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL Y REACTIVOS

Placas de cultivo celular (Costar, Corning, NY, USA); tubos cónicos de 1.5ml (Eppendorf, Hamburg, Germany); medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium), KSM (keratinocyte serum free medium), suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA); anfotericina B, gentamicina, tripsina/EDTA, saponina (Sigma, St. Louis Missouri, USA); Dispasa II (Roche, Mannheim, Germany); microscopia de contrastes de fases invertida (Axiovert; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany; incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA); cámara de Neubauer (Bright Line, Buffalo, NY, USA); citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA).

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Se obtuvieron 16 muestras de conjuntiva de pacientes de la Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”, sin importar sexo o edad, que fueron sometidos a cirugía de pterigiión o catarata. Se excluyeron aquellos pacientes que padecieran cualquier enfermedad de superficie ocular que involucrara el área de toma de la muestra.

Descripción de la técnica quirúrgica. Bajo anestesia local o tópica y con técnica estéril se disecaron fragmentos libres de Tenon, de 1 x 3 mm aproximadamente de la conjuntiva bulbar superior, 10 a 15 mm del limbo.

Manejo de la muestra conjuntival. Para su transportación se depositó la muestra en un franco estéril con solución salina o medio de cultivo RPMI 1640 y se mantuvo a 4°C, por un periodo no mayor de 12 h.

Cultivo celular. La muestra de conjuntiva fue procesada bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se tomó un fragmento de 1x1 aproximadamente y se colocó de forma extendida en cajas de pozos de cultivo, dejando reposar el tejido de 15 a 30 segundos para permitir su fijación. Se agregó 1 cc de medio de cultivo 1:1 de RPMI y Ham F10 suplementado con suero bovino fetal, mezcla antibiótico/antimicótico: penicilina, estreptomicina y anfotericina, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, factor de crecimiento epitelial (EGF).

Se cultivó en una atmósfera estándar para cultivo saturada con 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 °C. El medio se recambió cada tercer día. El tejido se retiró del pozo de cultivo al 7° día en promedio para evitar la contaminación con fibroblastos. Las células adheridas continuaron en desarrollo 10 a 13 días mas aproximadamente o hasta conseguir una confluencia superior al 80%.

Obtención de las células cultivadas. Para la obtención de las células se empleó tripsina-EDTA 0.25/0.03 % durante 10 minutos vigilando la disgregación celular con microscopio invertido. Posteriormente la reacción enzimática se detuvo con suero fetal bovino al 10%.

Inmunofluorescencia de las células cultivadas. La determinación de la expresión de proteínas intracelulares se realizó permeabilizando las células con saponina. Brevemente, las células obtenidas de cultivo fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min a 4°C, terminado el tiempo de incubación las células fueron lavadas con PBS en dos ocasiones y tratadas con saponina al 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente en agitación moderada. Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo y dirigidos contra MUC5AC y citoqueratina (CK), durante 30 min. Los datos se analizaron por citometría de flujo.

CITOMETRIA DE FLUJO. Se adquirieron 5000 eventos por duplicado en un citómetro de flujo evaluando las características fenotípicas en una ventana de tamaño vs. granularidad celular, presentando los resultados en imágenes dot-plot (Software CELLQUEST).

Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se utilizó esta metodología para determinar la expresión de transcritos de RNAm asociados a proteínas características de células conjuntivales (MUC5AC). El RNA total es aislado de las células conjuntivales cultivadas mediante el protocolo de isotiocianato guanidinium y sujeto a la digestión de DNasa libre de RNasa, extrayendo ambas con alcohol isoamil-fenol-cloroformo (24:24:1), precipitando con etanol, disolviendo en agua libre de RNasa y cuantificando espectrofotométricamente. Un microgramo del RNA total fué empleado para la síntesis de DNAc. El PCR se desarrolló con primers para MUC5AC. La primera

secuencia constó de: MUC5AC primer sentido, 5'-
TCCACCATATACCGCCACAGA-3', y primer contrasentido, 5'-
TGGACCGACAGTCACTGTCAAC-3'. La reacción de amplificación se realizó en el
termociclador. Las condiciones fueron: 3 minutos a 96°C, seguidos de 30 ciclos de
desnaturalización por 45 segundos a 96°C, amplificación por 1 minuto a 55°C, y extensión
por 1 minuto a 72°C. La longitud esperada del producto del PCR fue de 103 pares de bases.
El DNAc se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observó con
tinción de bromuro de etilio. El RNA total de la conjuntiva del fórnix se procesó como
control positivo. Como control negativo se tomó la muestra de pozos en los que no se
observó crecimiento celular.

RESULTADOS.

CRECIMIENTO CELULAR.

El desarrollo celular fue valorado mediante microscopía de contraste de fase en un microscopio invertido. Se observó una migración celular discreta a partir del borde del explante entre las 24 - 48 h posteriores a la implantación del tejido (**Figura 1**).

A partir de las 72 h fue posible identificar células con morfología epitelial (células poliédricas con núcleo central grande, que tienden a la confluencia) o con morfología similar a una célula mio-epitelial o fibroblástica (células fusiformes, núcleo pequeño) (**Figura 2**).

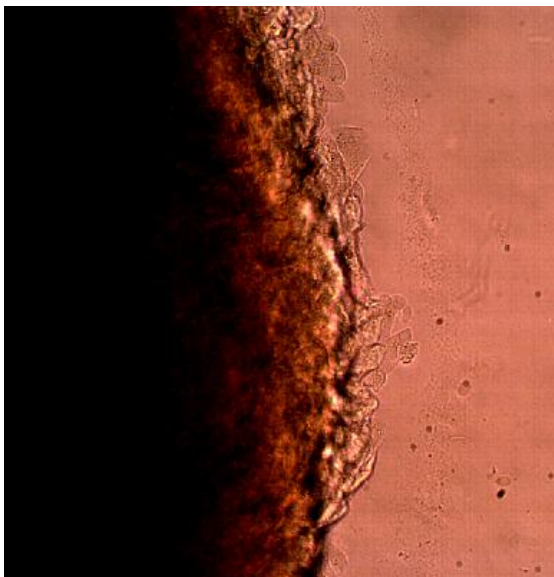


Figura 1. Microfotografía de contraste de fase del explante conjuntival. Se observa migración celular a partir del borde del explante a las 24 horas. 200x.

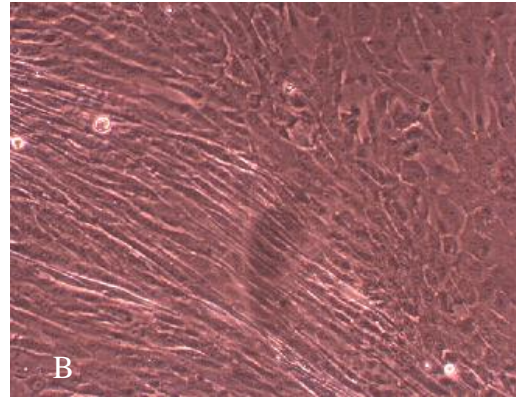
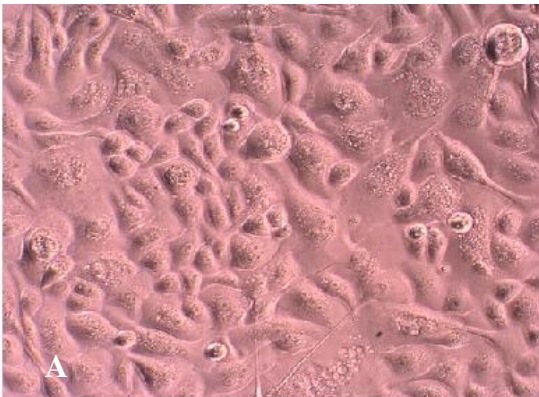


Figura 2. Identificación morfológica por contraste de fase. Las microfotografías muestran las diferencias morfológicas entre células epiteliales (A) y células similares a mio-epiteliales o fibroblásticas (B) a las 72h de cultivo celular. 400 x

CONFLUENCIA CELULAR. La confluencia celular superior al 80% se alcanzó entre el día 12 y 15 de cultivo (**Figura 3**).

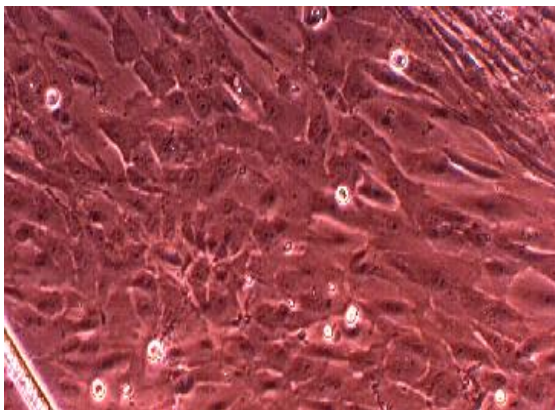


Figura 3. Microfotografía de contraste de fase a los 12 días de cultivo. Se observa la confluencia celular obtenida por las células epiteliales conjuntivales. 200x.

CARACTERIZACION FENOTIPICA

CITOMETRIA DE FLUJO

La caracterización fenotípica se realizó en primer lugar con citometría de flujo para determinar la expresión de citoqueratina (CK), que es un marcador característico de todas las células epiteliales ⁽¹⁸⁾ y de MUC5AC que es una mucina producida por células epiteliales conjuntivales. Los resultados mostraron que las células cultivadas fueron positivas para CK en un 88% y positivas para MUC5AC en un 89% (**Figura 4**).

Sin embargo, al realizar el análisis de la expresión de MUC5AC exclusivamente en las células epiteliales (CK+) se observó que el 100% de ellas eran MUC5AC+ (**Figura 5**).

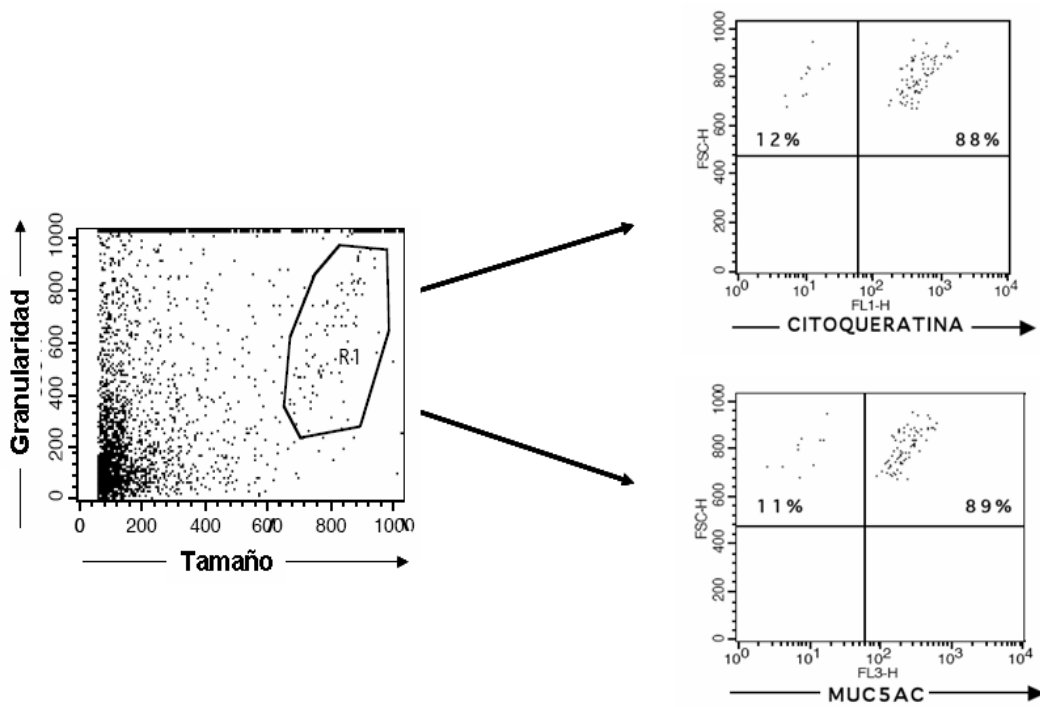


Figura 4. Citometría de flujo de las células epiteliales obtenidas en cultivo. Se observan las características de tamaño y granularidad (A) correspondientes a células epiteliales. En (B) se observa el porcentaje de células epiteliales positivas para CK y en (C) positivas para MUC5AC.

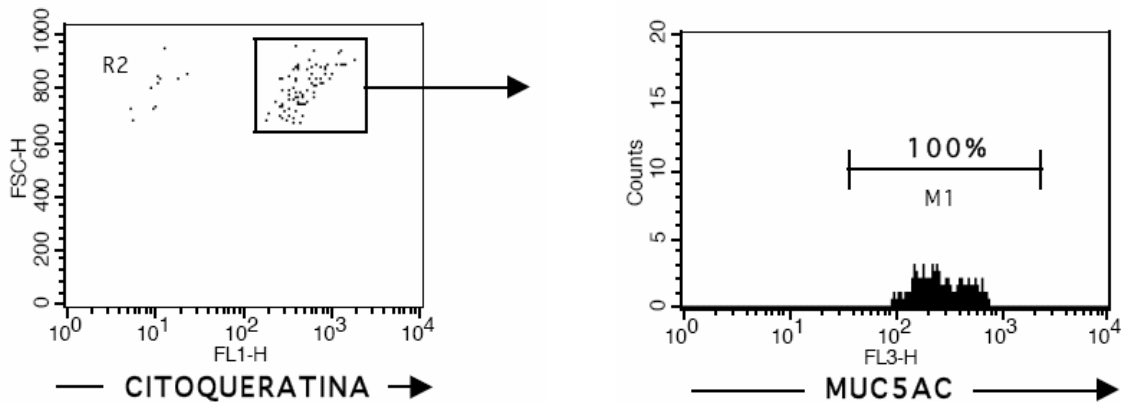


Figura 5. Análisis de la expresión de MUC5AC en células CK+. Se observa en el histograma que todas las células epiteliales son productoras de MUC5AC.

TRANSCRIPTASA REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Se realizó transcriptasa reversa reacción en cadena de la polimerasa para el RNAm de MUC5AC y GADPH, comparándose con un control positivo (tejido conjuntival recién obtenido). El gel muestra una banda de 103 pares de bases, que corresponde para MUCAC tanto de la muestra fresca como de las células cultivadas (**Figura 6**).

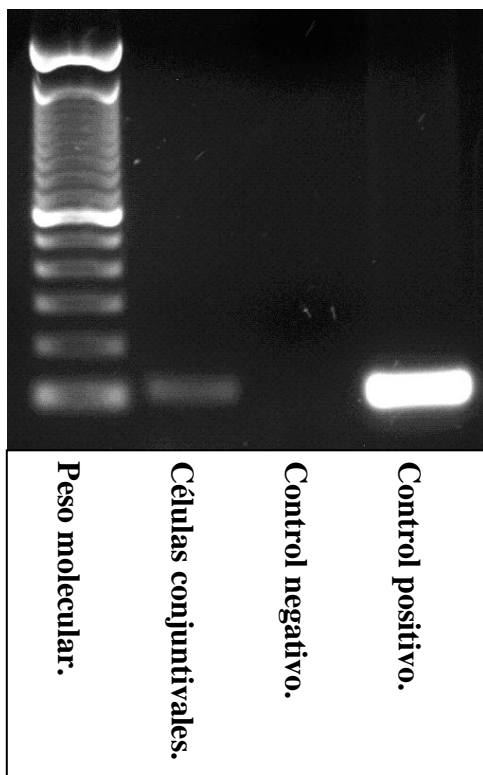


Figura 7. RT-PCR para MUC5A/C. Gel para MUC5AC. Se observa en el carril 1 los pesos moleculares, en el carril 2 las células cultivadas, en el carril 3 control negativo, en el carril 4 células conjuntivales recién obtenidas.

DISCUSION

La conjuntiva esta involucrada en muchos procesos que permiten mantener el bienestar de la superficie ocular. El epitelio contribuye a la formación de la lágrima y secreta diversas sustancias que participan en los procesos inmunes ⁽¹⁰⁾. Por ello destaca la importancia de rehabilitar dicho tejido cuando sufre alguna agresión.

Existe una larga lista de procedimientos desarrollados para restaurar la morfología de la conjuntiva que permitan la diferenciación apropiada del epitelio. ⁽³⁾ Entre estos procedimientos se encuentra la membrana amniótica, en la cual se ha observado que su membrana basal facilita la migración, diferenciación y adhesión epitelial. ⁽⁸⁾ Se han empleado autoinjertos previamente expandidos ex vivo con resultados satisfactorios en pacientes operados de pterigión. ⁽⁶⁾En nuestro medio no se han desarrollado los

procedimientos técnicos enfocados a la obtención de células conjuntivales, es por esto que en este trabajo se decidió implementar una técnica estandarizada de cultivo de células epiteliales conjuntivales humanas.

Nosotros observamos con la técnica de cultivo empleada tiempos de crecimiento celular similares a los reportados previamente ⁽²⁾, la similitud en tiempo y confluencia celular valida nuestra técnica. El siguiente paso, fue caracterizar tanto morfológicamente como fenotípicamente a las células así obtenidas. En este sentido observamos dos tipos celulares morfológicamente diferentes; células con características epiteliales y células con características mio-epiteliales o fibroblásticas. La presencia de estas últimas podría deberse a cambios en el microambiente con incremento en la concentración de Factor de crecimiento transformante-beta (TGF-b) y/o a la presencia de factor de crecimiento fibroblástico (FGF), como ha sido reportado por Jiménez-Martínez MC et al. en células epiteliales corneales en cultivo ⁽¹²⁾ y por Razzaque MS et al. durante la cicatrización conjuntival ⁽¹³⁾. Por lo que como perspectiva en este trabajo se encuentra pendiente la determinación de TGF-b en las células epiteliales conjuntivales cultivadas.

La presencia de otros subtipos celulares observados morfológicamente se pudo evidenciar al realizar la citometría de flujo en la que encontramos que aunque el porcentaje predominante de las células en cultivo eran de origen epitelial, porque fueron CK+, se observó un porcentaje menor de células CK-. La expresión de CK se encuentra restringida a células epiteliales ⁽¹⁴⁾, es por eso que se decidió utilizar en este estudio como marcador epitelial.

Otro tipo de marcador para la identificación de las células de tipo epitelial es la expresión de diferentes queratinas, tipos de mucinas y glicocálix. Las células conjuntivales caliciformes secretan MUC5AC, mientras que las células no caliciformes y epiteliales corneales expresan dos tipos de mucinas membranosas, MUC16 y complejo sialomucina. ⁽⁸⁾

La caracterización fenotípica asociada a su función secretora se realizó determinando la expresión de MUC5AC. MUC5AC es una mucina secretada por células epiteliales conjuntivales como por células caliciformes ⁽¹⁵⁾. Ésta es una de las principales mucinas formadoras de gel producida por las células caliciformes conjuntivales ⁽¹⁶⁾.

Encontrando que las células cultivadas fueron predominantemente MUC5AC+, lo que concuerda con los datos morfológicos y con el porcentaje de células epiteliales CK+. Cabe resaltar que al analizar exclusivamente las células CK+ se encontró que todas ellas fueron MUC5AC, lo que sugiere que a pesar de que en el cultivo había contaminación con otros tipos celulares, la pureza de la obtención de células epiteliales conjuntivales fue adecuada.

Por último para corroborar la caracterización funcional se decidió buscar los transcritos para RNAm de MUC5AC, puesto que se ha reconocido que la expresión de este es esencial en líneas celulares derivadas de conjuntiva ⁽¹⁷⁾. Los resultados obtenidos con esta técnica nos permiten sugerir que se trata de células productoras de mucinas formadoras de gel, específicamente MUC5AC.

En conclusión, la técnica desarrollada en este trabajo para obtener un cultivo primario de células epiteliales conjuntivales garantiza la conservación del fenotipo celular y funcional. Sin embargo, para garantizar esta última, es necesario realizar estudios funcionales y una vez realizados se podrá proponer la inmortalización de estas células para su uso en investigación básica y básica aplicada. Por lo pronto, esta técnica podía ser utilizada para crecer células conjuntivales sobre membrana amniótica y permitir la reconstrucción de la superficie ocular.

BIBLIOGRAFIA:

1. **Conjunctiva, organ and cell culture.** Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols. Monica Berry et al. Jones Humana Press Inc. 503-515.
2. **Yolanda Diebold, Margarita Calonge, Nieves Fernfindez, M. Carmen Lfizaro, Sagrario Callejo, Jose M. Herreras, J. Carlos Pastor.** Characterization of epithelial primary cultures from human conjunctiva. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997 235:268-276
3. **Douglas J Coster, Rajesh K Aggarwal, Keryn A Williams.** Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cell allografts. *British Journal of Ophthalmology* 1995;79:977-982.
4. **Leonard P. K. Ang, Donald T. H. Tan, Roger W. Beuerman, and Robert M. Lavker.** Development of a Conjunctival Epithelial Equivalent with Improved Proliferative Properties Using a Multistep Serum-Free Culture System. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1789-1795
5. **Ivan R. Schwab, Merle Reyes, R. Rivkah Isseroff.** Successful Transplantation of Bioengineered Tissue Replacements in Patients with Ocular Surface Disease. *Cornea* 19(4): 421-426, 2000.
6. **Leonard P.K, Donald T.H., Roger W. Beuerman.** Autologous Cultivated Conjunctival Transplantation for Pterygium Surgery. *Am J Ophthalmol* 2005;139:611-619.
7. **Kinoshita S, Nakamura T.** Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif Organs.* 2004 Jan;28(1):22-7.
8. **Meller, Scheffer C. G. Tseng.** Conjunctival Epithelial Cell Differentiation on Amniotic Membrane. *Daniel Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40: 878-886.
9. **Dogru M; Tsubota K.** Current concepts in ocular surface reconstruction. *Semin Ophthalmol.* 2005; 20(2):75-93
10. **Yolanda Diebold, Margarita Calonge, Amalia Enríquez de Salamanca, Sagrario Callejo, Rosa M. Corrales, Victoria Sa´ez,1 Karyn F. Siemasko, Michael E. Stern.** Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA_NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4263-4274.
11. **L P K Ang, D T H Tan, C J Y Seah, R W Beuerman.** The use of human serum in supporting the in vitro and in vivo proliferation of human conjunctival epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2005;89:748-752.
12. **Jiménez-Martínez MC, Mejía H, Linares M, Santacruz C, Sánchez-Navarro A, Suárez R, Garfias Y.** Expression of B7 molecules and TLR-9 on corneal epithelial cells infected with adenovirus: clinical-pathological implications in viral keratoconjunctivitis. *Arch Soc Esp Oftalm* 2006; 81:391-400.
13. **Razzaque MS, Foster CS, Ahmed AR.** Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 May;44(5):1998-2003.
14. **Oh JY, Kim MK, Shin KS, Shin MS, Wee WR, Lee JH, Ko SM, Lee JL.** Efficient cryopreservative conditions for cultivated limbal and conjunctival epithelial cells. *Cornea.* 2007 Aug;26(7):840-6.
15. **Gipson IK.** Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):379-88.
16. **Hitoshi Watanabe.** Significance of Mucin on the Ocular Surface. *Cornea* 21(Suppl. 1): S17-S22, 2002.
17. **Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Ng TF, Russo CL.** Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jun;44(6):2496-506.
18. **Krenzer KL, Fredo TF.** Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 Jan;38(1):142-52.