



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Cultivo de células epiteliales de limbo
corneal sembradas sobre membrana
amniótica humana radioesterilizada**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Ana María Brena Molina



DIRECTOR DE TESIS:

**Doctora María Cristina Velasquillo
Martínez**

2011



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Cultivo de células epiteliales de limbo
corneal sembradas sobre membrana
amniótica humana radioesterilizada**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Ana María Brena Molina



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María Cristina Velasquillo Martínez**

**ASESOR DE TESIS:
M. en C. Carlos Landa**

2011

Hoja de datos del jurado

Datos del alumno	
Apellido paterno:	Brena
Apellido materno:	Molina
Nombre (s):	Ana María
Teléfono:	57890481
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela:	Facultad de Ciencias
Carrera:	Biología
Número de cuenta:	301016090
Datos del tutor	
Grado:	Doctora
Nombre(s):	María Cristina
Apellido paterno:	Velasquillo
Apellido materno:	Martínez
Datos del sinodal 1	
Grado:	Doctor
Nombre (s):	Alejandro
Apellido paterno:	Zentella
Apellido materno:	Dehesa
Datos del sinodal 2	
Grado:	Doctora
Nombre (s):	Rosario
Apellido paterno:	Ortíz
Apellido materno:	Hernández
Datos del sinodal 3	
Grado:	Doctora
Nombre (s):	María Esther
Apellido paterno:	Martínez
Apellido materno:	Pardo
Datos del sinodal 4	
Grado:	M. en C.
Nombre (s):	Leticia
Apellido paterno:	Vázquez
Apellido materno:	Maya
Datos del trabajo escrito	
Título:	Cultivo de células epiteliales de limbo corneal sembradas sobre membrana amniótica humana radioesterilizada
Número de páginas:	59
Año:	2011

A mis padres

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (I.N.R) bajo la dirección de la doctora María Cristina Velasquillo Martínez y la asesoría del M. en C. Carlos Landa Solís. Gracias al I.N.R por los nuevos conocimientos y el desarrollo de los obtenidos a lo largo de la carrea, lo cual será la base para mi futuro profesional.

Agradezco al Hospital General de México, y a la doctora Leticia Vázquez Maya por la donación de los casquetes del limbo corneal para su posterior procesamiento en las instalaciones del I.N.R.

Agradezco también al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (I.N.I.N) y a la Doctora María Esther Martínez Pardo responsable administrativa del Banco de Tejidos Radioesterilizados del I.N.I.N, por la donación de los amnios utilizados en el presente trabajo

Agradecimientos personales:

Con todo mi corazón y alma le doy el mayor e infinito agradecimiento a mis papás, que con su esfuerzo y sacrificio diario han guiado mi camino hasta lo que soy ahora. Mamá, gracias por todo el amor y cariño que siempre nos das, gracias por ser una mujer luchona, inteligente y trabajadora, con tu ejemplo es suficiente para querer ser una mejor y preparada persona en el día a día. Papá, no conozco ser más sabio que tú, el verte siempre leyendo, investigando, en tus debates, me impulsó a tomar un camino de curiosidad por las cosas. Quiero que sepan que trataré siempre de hacerlos sentir orgullosos.

A mis hermanos Marisol y Javier, por llenar mi vida de alegría, por su apoyo y por estar conmigo siempre en las buenas y malas, que seguirá habiendo pero sé que estaremos los tres siempre juntos.

A Carlos Alberto Nolasco, por tu amor y apoyo en cada paso de mi vida desde hace cinco años, por la complicidad, por darme esta inmensa tranquilidad, por la intranquilidad que me causas, por lo que nos venga de frente!

A mis tíos: Lulú, Carmen, Vicky y Emiliano y a mis primos: Ale, Carmen, Citla y Hatsi, por su cariño y por qué las reuniones familiares son la onda. A mi abuelito Santos Molina que aunque ya no está conmigo desde hace 8 años no hay día que no piense en él y al resto de mi querida familia con cariño.

A la familia Nolasco-Donjuan por abrirme su corazón.

A la Escuela Nacional Preparatoria 2 “Erasmus Castellanos Quinto” donde comencé mi formación universitaria, gracias por darme los mejores amigos, mis hermanos: Abigail, Paola, Ale, Ferrus, Hugo y Jonathan.

A la H. Facultad de Ciencias, por darme las armas necesarias para mi futuro profesional y por los amigos que hice a mí paso en ella: Yunuén, Mario, Belén, Diana, Eva y Vero.

A mi asesora la doctora María Cristina Velasquillo, quién es un ejemplo a seguir tanto profesional como a nivel personal, gracias por transmitirme esa pasión y entrega de un científico hacia su trabajo, también por el afecto brindado en estos años.

A mis amigos del laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del I.N.R: Zaira, Carmina, Ricardo y en especial a mi sensei Carlos Landa (por las enseñanzas, tu amistad y regaños. Nam-myoho-rengo-kyo) gracias chicos por todos los buenos momentos que me han dado dentro y fuera del instituto, los quiero. Al personal académico del laboratorio: Valentín, doctor García-Diego, doctora Carmen gracias por los consejos para mi tesis.

A mis sinodales por el tiempo y recomendaciones para mi trabajo:

Dr. Alejandro Zentella, Dra. Rosario Ortíz, Dra. María Esther Martínez y Dra. Leticia Vázquez.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra máxima casa de estudios, porque siempre será un orgullo decir: soy de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

GOYA, GOYA, CACHUN CACHUN RA RA, CACHUN CACHUN RA RA, GOYA...
UNIVERSIDAD!

Y por último pero no menos importante quiero agradecer a dios, a esa energía que está con cada uno de nosotros por ponerme en el camino del conocimiento y entendimiento de la vida, para saber un poco más que ayer acerca de nuestro entorno, de lo que estamos hechos y como funcionamos.

ÍNDICE

Índice.....	1
Resumen.....	3
Introducción.....	4
-Estructura Ocular.....	4
- Zona del limbo	10
-Estructura Corneal.....	11
-Células epiteliales limbales (CEL).....	11
-Deficiencias en las CEL y tratamiento.....	11
-Membrana amniótica humana (MAH).....	12
-Células troncales.....	12
- Limbo corneal, fuente de células troncales.....	13
Antecedentes.....	14
Justificación.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
-Objetivos Generales.....	18
-Objetivos Particulares.....	19
Metodología.....	19
-Recolección de la muestra.....	19
-Procesamiento de la muestra.....	20
-Cuantificación celular.....	21

-Cultivo celular.....	21
-Viabilidad celular.....	23
Citometría de flujo.....	24
Inmunohistoquímica.....	25
-Fijación.....	26
-Oxidación endógena y bloqueo.....	26
-Inmunoreacción.....	27
- Tinción.....	28
Resultados.....	29
-Viabilidad de los remanentes de tejido limbo corneal	29
-Fenotipo celular.....	31
-Viabilidad celular a la MAHR.....	33
-Análisis de adhesión celular mediante tinciones histoquímicas.....	34
-Caracterización de las células mediante su inmunofenotipo.....	35
Discusión.....	36
Conclusión.....	41
Bibliografía.....	42
Anexos.....	51

Resumen

Las técnicas empleadas para el tratamiento de las lesiones corneales en la actualidad utilizan limbos donados ó células de ojos sanos, sin embargo gracias al desabasto de tejidos y la baja celularidad por enfermedades hace necesaria la expansión celular y su utilización para la generación de sustitutos biológicos para reparar lesiones de la córnea. Mediante el uso de un soporte a base de una membrana amniótica humana radioesterilizada con radiación gamma del cobalto-60 (^{60}Co) (MAHR) y células limbocorneales *in vitro*, se pretende desarrollar un sustituto biológico que promueva la proliferación y diferenciación epitelial que pueda ser utilizado en el tratamiento de lesiones corneales. **Objetivo:** Valorar si la MAHR, es un sustituto que permita que las células troncales presentes en el limbo corneal se diferencien. **Material y métodos:** Fueron utilizadas muestras de limbo corneal de los remanentes de cirugías de trasplante de córnea humana, se disgregaron mecánicamente y se sometieron a digestión enzimática cultivandose en cajas de 25 cm² hasta primer pase, en cada uno de los pases se tomaron alícuotas de 5×10^5 células/ ml para su marcaje con el siguiente panel de anticuerpos monoclonales CD14, CD34, CD90, CD117, CD73 y CD47. Durante el primer pase se sembraron 2×10^5 células/ml sobre fragmentos de la MAHR de 1 cm de radio y se cultivó durante tres semanas hasta alcanzar el 100%, un fragmento fue teñido con el kit LIFE/DEAD para establecer la viabilidad de las células en la MAHR, los fragmentos restantes fueron fijados con una solución de formaldehído amortiguado y se procedió a realizar inmunohistoquímica para citoqueratina 12, 19 y vimentina, como marcadores de identidad del fenotipo epitelial. **Resultados:** El inmunofenotipo se mantuvo constante en cultivo hasta el primer pase. La inmunohistoquímica fue positiva para citoqueratina 12 y vimentina y negativa para citoqueratina 19. **Conclusiones:** La MAHR parece estar favoreciendo la maduración de las células troncales epiteliales; por lo tanto su uso podría ser un sustituto biológico potencial en la reconstrucción de lesiones corneales.

Introducción

Estructura ocular

Los ojos son órganos complejos sensitivos que nos proporcionan el sentido de la vista. A menudo se les compara con una cámara fotográfica simple, con una lente que captura y enfoca la luz y una película fotográfica que registra la imagen. En el ojo, la córnea y el cristalino concentran y enfocan el rayo luminoso sobre la retina. (47). La estructura tridimensional del ojo juega un papel importante proporcionando un ambiente óptico correcto para la visión. Muchas de estas funciones son dependientes de la estructura del tejido ocular conectivo. La organización de las fibras de colágena es en gran parte, responsable de la transparencia y refracción de la córnea, cristalino y cuerpo vítreo, así como el colágeno presente en la esclerótica es mayormente responsable de la fuerza estructural del ojo. (48) (Fig. 1.)

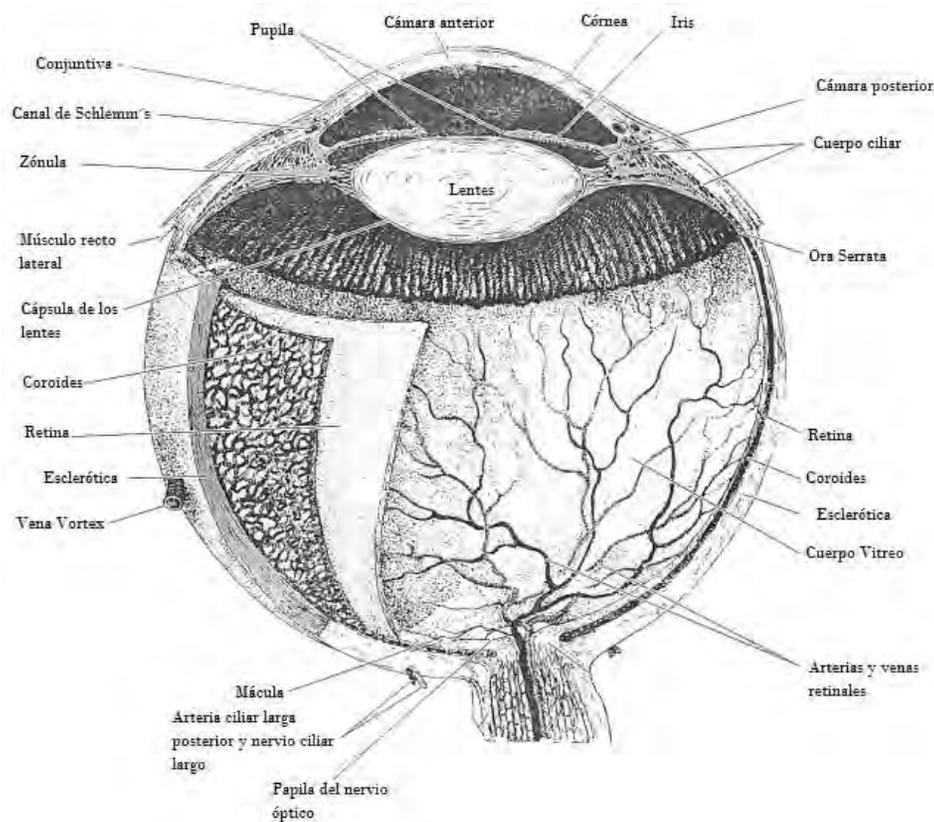


Figura 1: Estructuras internas del ojo humano, modificado de Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro. Basic Histology text and Atlas. 2005.

El globo ocular mide alrededor de 25 mm de diámetro (Fig.1). Está suspendido en la órbita mediante seis músculos extrínsecos que controlan sus movimientos. El globo ocular se organiza de modo tal que se puede considerar que está compuesto por tres capas estructurales (47).

- La esclerótica o túnica fibrosa: Es la capa externa o fibrosa que incluye la esclerótica y la córnea
- La úvea o túnica vascular: Es la capa intermedia o vascular que incluye la coroides y el estroma del cuerpo ciliar y el iris.
- La retina o túnica nerviosa: Es la capa interna que incluye un epitelio externo pigmentario, la retina nerviosa interna y el epitelio del cuerpo ciliar y el iris (Fig. 2).

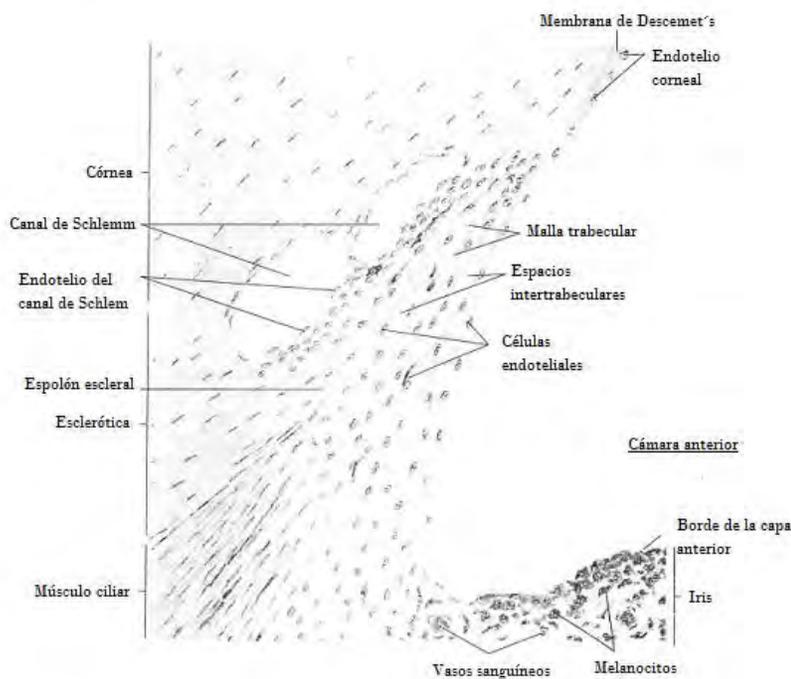


Figura 2: Estructuras internas del globo ocular, sección meridional. Modificado de Shu-Xin Zhang, 1999.

La capa esclerótica o túnica fibrosa se compone de la córnea transparente y la esclerótica, opaca y blanca. En esta región semejante a una ventana, la superficie del globo ocular presenta una prominencia o convexidad anterior, la córnea se continúa con la esclerótica compuesta por tejido conectivo fibroso denso al que se fijan los músculos extrínsecos del ojo (47). Al tener una curvatura mayor que la esclerótica, la córnea presenta el aspecto de un vidrio de reloj. La córnea es el primer y más poderoso medio refractante en el ojo. La luz pasa a través de la córnea en su camino a la

retina. Las bases de la transparencia de la córnea son más fisiológicas que anatómicas: la homogeneidad óptica es mantenida por un continuo bombeo hacia el exterior del líquido intersticial a través de las membranas superficiales semipermeables, de modo tal que la córnea es mantenida en un estado no turgente (50) (Fig. 3).

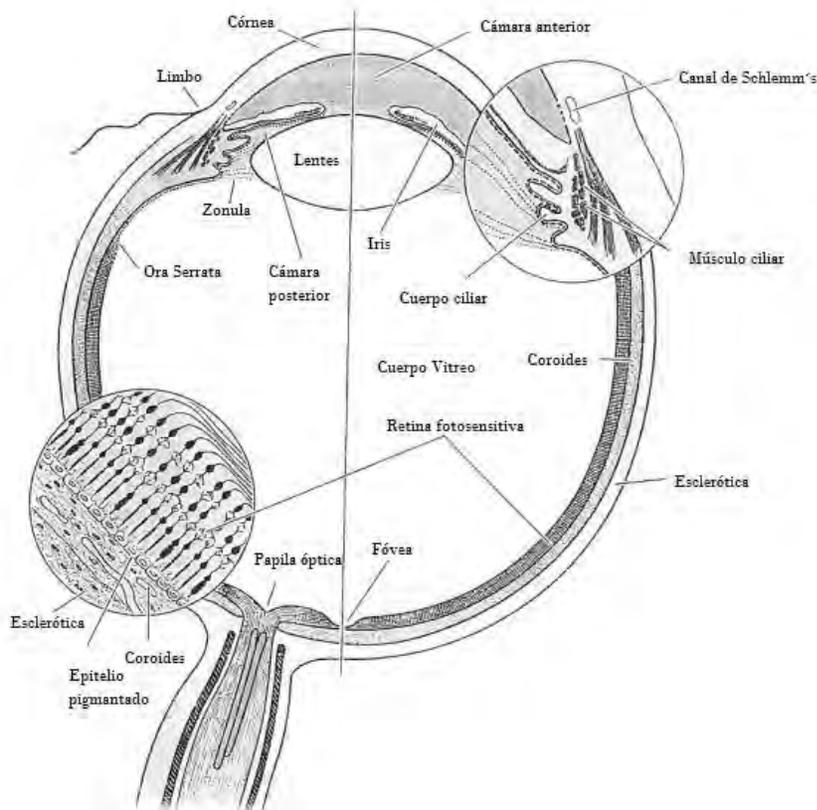


Figura 3: Estructura del ojo, retina, fovea, y cuerpo ciliar. Modificado de Luiz Carlos Junqueira *et al.*, 2005.

Estructura Corneal

La córnea es la capa anterior transparente, no vascularizada y altamente innervada, que recubre la sexta parte restante del globo ocular (Fig. 4). Se une a la esclerótica en una región llamada limbo, muy vascularizada, la córnea está formada por cinco capas (47, 50,52), y es algo más gruesa que la esclerótica. Mide de 0.8 a 0.9 mm en su centro y 1.1 mm en la periferia, con 0.5mm de espesor (47, 50, 53). Se compone de tres capas celulares distintas en aspecto y origen. Las capas están separadas por dos laminillas importantes que parecen ser amorfas cuando se

observan con el microscopio óptico. Las cinco capas que se distinguen en un corte transversal de la córnea son (Fig.4):

– Primera capa. Epitelio anterior o epitelio corneal (figura 4): El epitelio de la córnea es de tipo plano escamoso estratificado y no queratinizado, con un grosor promedio de 50 μ m, compuesto por 5-6 capas de células adherentes estrechas sometidas a un proceso continuo de autorrenovación y regeneración, con las células epiteliales superficiales siendo constantemente liberadas en una película lagrimal y sustituida con un recambio de 4-6 días (55). El epitelio corneal recubre la superficie anterior de la córnea y se continúa con la conjuntiva (una membrana mucosa que recubre la esclerótica anterior y reviste la superficie interna de los párpados (52).

Las características del epitelio corneal que lo hacen único son las siguientes: El primero reside en su estructura dado que el epitelio corneal se encuentra sobre un estroma extremadamente plano sin redes, las células basales individuales se someten a una demanda excepcional para mantener el balance entre proliferación, diferenciación, y muerte celular. El segundo consiste en la aparente falta de protección; donde el epitelio corneal es totalmente sin pigmentación, considerando que las células basales están expuestas al daño por agentes externos como la radiación solar. (50)

Un epitelio corneal no queratinizado y estratificado es esencial para una visión apropiada. Se piensa que las células epiteliales corneales derivan de células madre (stem) localizadas en el limbo (57).

La córnea posee una notable capacidad regenerativa con un tiempo de recambio de alrededor de 7 días. Las abundantes terminaciones nerviosas libres presentes en la córnea la tornan muy sensible al tacto. La estimulación de estos nervios, por ejemplo por cuerpos extraños produce parpadeo, flujo de lágrimas y a menudo dolor severo. Las microvellosidades que se encuentran en las células epiteliales de la superficie contribuyen a retener la película lagrimal sobre toda la superficie de la córnea. Si la córnea se reseca se pueden producir ulceraciones. Las lesiones menores de la superficie de la córnea curan con rapidez, debido a la migración celular que tiende a reparar el daño. (47, 52,53) Al igual que ocurre con otras formas de epitelio plano estratificado, las células aparecen unidas por numerosas prolongaciones entrelazadas que se adhieren a los desmosomas. El citoplasma contiene abundantes mitocondrias y cisternas dispersas de retículo

endoplásmico granular o rugoso en una matriz en la que existen grandes cantidades de filamentos intermedios orientados al azar. (53)

Las células epiteliales corneales humanas han sido utilizadas satisfactoriamente para la reconstrucción corneal. Los sistemas de células individuales o en explante son utilizados actualmente para cultivo epitelial corneal humano (56).

Existen marcadores que son utilizados ampliamente para identificar células epiteliales corneales diferenciadas, dentro de los cuales se encuentran las citoqueratinas o queratinas 3, 4, 12 y 13, que son un grupo de proteínas del citoesqueleto que forman filamentos intermedios en células epiteliales y son expresadas en distintos patrones durante el desarrollo y diferenciación epitelial (28,29,30,31,33).

– Segunda capa. Membrana de Bowman o lámina limitante anterior (figura 4): Denominada así en honor de un oftalmólogo y anatomista del siglo XIX, la membrana de Bowman no es una membrana en el sentido habitual del término, si no una capa acelular con un espesor de aproximadamente 30 μm . Se encuentra inmediatamente por debajo del epitelio en toda la extensión de la córnea (47). Esta capa se encuentra constituida de fibras cortas de colágeno de 18 nm en disposición desordenada y de fibrillas finas, las que se originan al parecer en la membrana basal del epitelio basal. La membrana de Bowman finaliza de manera abrupta en el limbo, la unión esclerocorneal (47,54). La membrana de Bowman proporciona resistencia a la córnea y es una barrera contra la diseminación de infecciones, sin embargo no se regenera. En consecuencia si se lesiona, se forma una cicatriz opaca que altera la visión (47).

–Tercera capa. El estroma o sustancia propia (figura 4): El estroma constituye el 90% de espesor de la córnea, se compone alrededor de 60 delgadas laminillas de haces paralelos de fibras de colágena tipo I, organización que da la forma y consistencia. Entre las fibras se encuentran queratinocitos y láminas casi completas de finos fibroblastos aplanados, las fibras de colágeno están inmersas en una sustancia basal compuesta principalmente por condroitin y queratán sulfato. (47,52, 54). Las fibrillas miden unos 23 nm de diámetro y hasta 1 cm de largo. La sustancia fundamental contiene proteoglicanos corneales, glucosaminoglucanos sulfatados unidos a proteínas por enlaces covalentes. Se cree que el espaciamiento uniforme de las fibrillas además de la disposición ortogonal de las laminillas (capas alternadas en ángulos rectos) son responsables de la transparencia de la córnea. Los proteoglicanos junto con el colágeno tipo V, regulan el diámetro y el

espaciamiento preciso de las fibrillas de colágeno. A excepción de células migratorias ocasionales, y la presencia de nervios poco visibles en sus capas más anteriores, el estroma no presenta elementos especializados (54). La córnea normal carece de vasos sanguíneos y de pigmentos.

– Cuarta capa. Membrana de Descemet ó lámina limitante posterior (figura 4) : La membrana de Descemet denominada así por un oftalmólogo, botánico y médico clínico parisiense del siglo XVIII, es una capa hialina acelular de aproximadamente 10 μm de espesor, que se encuentra inmediatamente después del estroma corneal (52, 54). Separa el epitelio posterior de la córnea del estroma adyacente. A diferencia de la membrana de Bowman, la membrana de Descemet se regenera con facilidad después de una lesión. Además aumenta lentamente de espesor con la edad. La membrana de Descemet se extiende por la periferia, por debajo de la esclerótica, como una red denominada ligamento pectíneo o pectinado. Cordones de ligamento pectíneo se insertan en el músculo ciliar y en la esclerótica y contribuyen a mantener la curvatura normal de la córnea, al ejercer presión sobre la membrana de Descemet. (47)

La periferia de la córnea con frecuencia está engrosada por un haz de fibras circulares, que forman la línea de Schwalbe. El borde anterior de la membrana de Descemet es liso y se encuentra firmemente unido al estroma corneal profundo, su superficie posterior es también lisa, pero con la edad regularmente se desarrollan excrescencias rugosas en las porciones periféricas (cuerpos de Hassal Henle) (54).

– Quinta capa. Epitelio posterior o endotelio de la cámara anterior (figura 4): El epitelio que constituye alrededor de la décima parte del espesor total de la córnea tiene 5 células de grosor con una superficie anterior excepcionalmente lisa, las células están unidas entre sí mediante uniones estrechas relativamente permeables y desmosomas. Con excepción de su estratificación las células basales no demuestran una tendencia hacia la diferenciación, ya sea a células mucosas o cualquier otra especialización. Por medio del microscopio electrónico se observa que el epitelio consiste de células densamente agrupadas con un citoplasma fibrilar fino y organelos relativamente escasos. Las células superficiales son nucleadas con una fina estructura vermiforme en su superficie, encargada tal vez de mantener la humedad de la superficie epitelial (54). El endotelio corneal reviste la superficie posterior de la córnea. Es un epitelio escamoso simple con células que presentan numerosas vesículas pinocíticas. Reabsorbe líquido del estroma y de esta manera contribuye a la transparencia de la córnea, la cuál determina la refracción de luz. (52). Casi todos los intercambios metabólicos de la córnea se producen a través del epitelio posterior. La lesión

física o metabólica del epitelio posterior causa la inmediata tumefacción de la córnea y, si el deterioro es suficientemente severo, la opacidad de la córnea (47), lo que conlleva a pérdida o disminución de la visión.

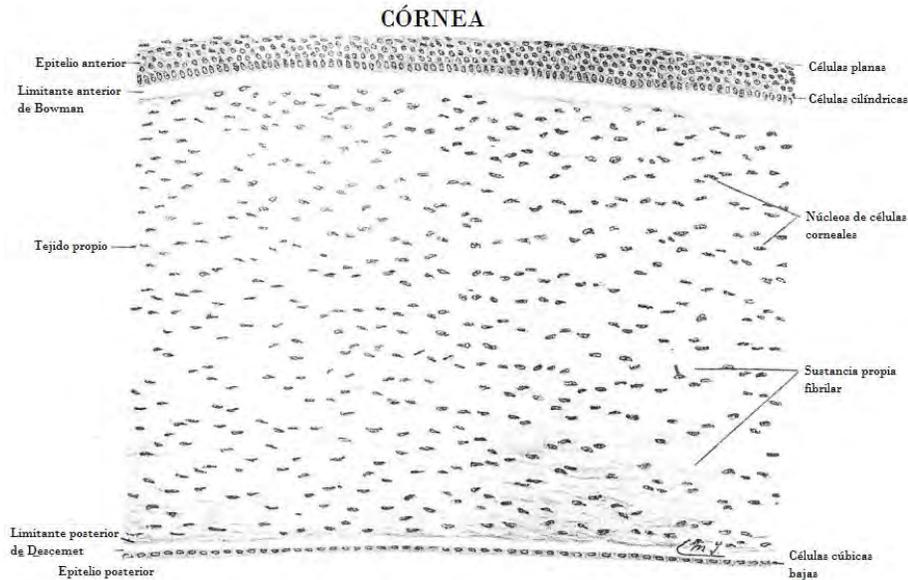


Figura 4: Magnificación de la Córnea Humana. Modificado de Shu-Xin Zhang, 1999.

Zona limbar

En la región del limbo posee unos canales, revestidos por un endotelio, que forman el conducto de Schelemm. Este conducto drena al sistema venoso el líquido de la cámara anterior del ojo. (52). El limbo es la línea imaginaria que une las terminaciones periféricas de las membranas de Bowman y de Descemet constituye el límite de la córnea con la esclerótica (54), también es conocido como la zona de transición entre la córnea y la esclerótica. Además de las terminaciones de las membranas de Bowman y Descemet, en el limbo se encuentran la transición del epitelio conjuntival a epitelio corneal, el límite periférico de la coloración metacromática del estroma corneal y la importante red trabecular en el ángulo de la cámara anterior. En el limbo, el epitelio de la córnea adquiere un espesor de 7 a 8 células y se transforma gradualmente en el epitelio conjuntivo mediante la formación de espacios intercelulares y de invaginaciones basales. La disposición en las láminas de las fibras de colágeno de la córnea se torna irregular y la fibra individual aumenta de tamaño a medida que se fusiona con la esclerótica. En esta zona se encuentran numerosos vasos sanguíneos y fibras nerviosas mielínicas (54).

Células epiteliales limbales (CEL)

La superficie ocular normal cubierta por epitelio limbal, conjuntivo y corneal no queratinizado con distintos fenotipos (1,3,5,20) tiene la capacidad de regenerarse rápidamente debido a la capacidad de regeneración que presentan las células epiteliales limbales (CEL) (7,33). Las CEL constituyen la fuente primaria del epitelio corneal y se caracterizan por tener la capacidad de autorrenovación originando otras células llamadas “células amplificadas en tránsito”, que a su vez se diferencian en las células del epitelio anterior corneal. El aporte insuficiente o ausencia de CEL provoca alteraciones en la reparación epitelial corneal trayendo como resultado defectos epiteliales persistentes, neovascularización, cicatrización, ulceración o una probable perforación corneal. (2). El Epitelio Corneal no queratinizado es esencial para una buena visión.

La superficie ocular está cubierta por dos diferentes tipos de epitelios: el conjuntivo y el epitelio corneal. (4). Las células mesenquimales del estroma límbico (CMEL) se encuentran en la lámina basal del limbo, la zona transicional entre la córnea y conjuntiva bulbar (8,22,28).

Deficiencias en las CEL y tratamiento

Las células del epitelio limbal corneal se pierden completamente u obtienen severas deficiencias, cuando los pacientes padecen enfermedades oculares tales como el síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide ocular cicatrizal y daño corneal por quemaduras, causando opacidad de la córnea, inflamación crónica de esta y pérdida parcial o total de visión (1,2,3,5,8,9,15,16,22,28). En los casos de daño severo, las células del epitelio limbal y central se pierden, entonces las células epiteliales de la conjuntiva invaden la superficie corneal, teniendo como resultado una conjuntivalización anormal de la córnea (9,18). Sumado a esto, existen enfermedades oculares como glaucoma, y degeneración retinal que causan ceguera afectando seriamente la visión (26). El tratamiento más común para los defectos corneales es el trasplante de células troncales del estroma límbico obtenidas de donadores fallecidos (16,32), como una alternativa para evitar el rechazo de tejido corneal por parte de los pacientes (1,6). Otros métodos propuestos son el trasplante de células de córnea *in vitro* sobre una membrana amniótica (5).

Membrana amniótica humana (MAH)

La MAH es la capa más interna de las membranas de la placenta, es discoide, posee un diámetro de entre 15 y 25 cm, aproximadamente 0.02 - 0.5 cm de espesor, un peso de entre 500 y 600 g, consiste en una membrana basal delgada con un estroma avascular (4,14). La MAH se divide en tres capas: monocapa epitelial, membrana basal densa, y una matriz estromal avascular (31). Esta puede servir como sustrato para cubrir el daño del estroma corneal (2).

La MAH o amnios, consta de una sola capa de epitelio derivada del ectodermo, uniformemente organizada en la membrana basal, la cual es una de las membranas más gruesas encontradas en cualquier tejido humano, y es una capa mesenquimal rica en colágeno (105). Esta capa mesenquimal puede subdividirse en la capa compacta que forma el esqueleto fibroso principal de la HAM, la capa de fibroblastos y la capa intermedia la cuál es llamada también zona esponjosa (106).

La MAH para su aplicación clínica se emplea: fresca, liofilizada o congelada. Se ha descrito que la membrana fresca (preservada a 4-8 °C) es mejor que la membrana congelada a -70°C (36). Sin embargo, la MAHR con radiación gamma a una dosis de 25 kGy ofrece una mayor seguridad biológica a los pacientes, ya que se encuentra libre de bacterias, organismos fúngicos, además con el uso de pruebas serológicas en el momento del parto y 6 meses después se asegura la no transmisión del virus de VIH, hepatitis B y C, y sífilis asegurando un nivel de esterilidad de 10^{-6} (37).

Células troncales

Las células troncales son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un elevado potencial proliferativo y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir de formar células idénticas a las células de origen y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo (98,102). Dependiendo de su origen, las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias y somáticas (97,100). Aunque han recibido otras denominaciones, de tal forma que en los artículos pioneros se encuentra el término en inglés, *stem cells*, ahora, dependiendo de la región geográfica donde se les investiga y de la respectiva traducción, es el nombre utilizado (101).

Las células troncales embrionarias derivadas del blastocisto (CTE) son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo. Por su parte las células troncales somáticas son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico (97,101). La diferencia principal entre ambos grupos radica en el grado de indiferenciación o potencialidad que conservan para originar diferentes tipos celulares (99).

Limbo corneal, fuente de células troncales

Las células troncales son consideradas la fuente primaria del epitelio corneal, las cuáles se encuentran en la región del limbo. Estas células troncales dan origen a las células amplificadas de tránsito (TACs) que a su vez se dividen para dar lugar a células cada vez más diferenciadas hacia la zona del epitelio corneal (102). No sólo las células troncales garantizan la autorrenovación del epitelio corneal, también son responsables de la reparación y regeneración del tejido a lo largo de la vida adulta del individuo (102). La determinación de localización de las células troncales limbares fue a partir de un estudio sobre la expresión de la queratina corneal de 64kD. En dichos estudios se sugirió que las células TAC están localizadas en la capa basal corneal y las células postmitóticas en las capas suprabasales. Conforme las células troncales limbocorneales van migrando desde el limbo al centro de la córnea, se van diferenciando en células epiteliales corneales maduras o diferenciadas (103). Existe una hipótesis propuesta por Thoft y cols. (1983) que explica la renovación del epitelio corneal por medio de tres ejes. El eje X, que consiste en la proliferación de las células basales, el Y, que consiste en la proliferación y migración centripeta de las células limbares y el Z, que consiste en la pérdida de células epiteliales de la superficie corneal (Fig.5) (104).

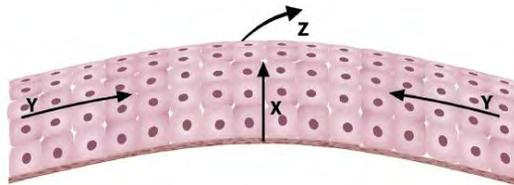


Fig. 5. Representación gráfica de los tres ejes descritos en la hipótesis de Thoft, en donde la X representa la proliferación de las células basales, Y, representa el movimiento centripeto de las células y Z, representa la pérdida celular de la superficie.

Antecedentes

El uso de la MAH en Oftalmología se realizó por primera vez en 1940, cuando Rotth la emplea en la reparación de defectos de la conjuntiva, los resultados sin embargo no fueron satisfactorios (42). En 1946 y 1947, Sorsby y col. reportan resultados exitosos en el tratamiento de quemaduras químicas oculares con MAH, proceso que denominaron <amnioplastia> (43,44). Por razones no explicadas en la bibliografía el uso de la membrana amniótica humana perdió popularidad, hasta que en 1993 Juan F. Batlle y col. experimentaron con la membrana placentaria como sustituto de la conjuntiva (45), y no fue hasta 1995 que Kim y Tseng (46), retomaron la experimentación con MAH introduciendo el trasplante de membrana amniótica preservada en el tratamiento de la patología de la superficie ocular, en conejos tras la extirpación del epitelio corneal y queratocoma lamelar limbal.

Las células troncales del estroma límbico pueden ser tomadas del ojo sano del paciente, éste procedimiento no puede llevarse a cabo en pacientes con lesiones en ambos ojos; también puede obtenerse tejido de otro donante, el cual es denominado aloinjerto (3,4,5,8,29). Para evitar el rechazo del alotrasplante, varios pacientes con deficiencias unilaterales (de un solo ojo) obtienen implantes contruidos ex vivo, por cultivos celulares en MHA (8). La queratoplastia penetrante es un procedimiento quirúrgico clásico, en el cuál tanto la córnea como el epitelio corneal, estroma y lámina endotelial son reemplazadas (13, 15, 27).

El cultivo primario de células del estroma corneal es aislado y expandido en una monocapa (34) todas las células se mantienen en medio EpiLife® Medium w/o Calcium (Cat. No. M-EPICF-500), el cuál es un medio de crecimiento epitelial que al ser combinado con factores de crecimiento promueven la actividad celular (34). Se ha sugerido que los cultivos de células del estroma corneal se mantengan en este medio cambiándolo cada dos días, y manteniéndolo en un incubador humidificado a 37°C en 5% de CO₂ (34).

Debido a las características intrínsecas de regeneración del tejido corneal, se han planteado diversos procedimientos, entre los cuales la ingeniería de tejidos se presenta como una alternativa para el tratamiento de lesiones corneales.

La MAH proporciona una membrana basal que facilita la migración de las células epiteliales, la adhesión del epitelio basal, promueve la diferenciación celular y previene la apoptosis celular (14). La MAH se ha utilizado en tratamientos de insuficiencia limbal (25), también en

reconstrucción de córneas dañadas en animales de laboratorio y domésticos (26, 27). El trasplante con MAH puede proveer un buen sustrato para la proliferación de células madre limbales, promoviendo así el recubrimiento del daño de la superficie ocular (28).

En Hospital General de México el grupo de Vázquez–Maya ha empleado con éxito la Membrana Amniótica Radioesterilizada con cobalto-60 (^{60}Co) para la reconstrucción de la superficie ocular (38). En México, el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) de el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) que se estableció en 1999, procesa y esteriliza con radiación gamma del cobalto-60, tejidos como el amnios y piel de cerdo (39). Estos tejidos han sido utilizados como apósitos en pacientes con quemaduras de primero, segundo y tercer grado, úlcera y epidermólisis bulosa.

Para tener un suministro de la membrana amniótica humana o amnios, el I.N.I.N firmó un convenio general de colaboración con el Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM) así como el Acuerdo Específico de Colaboración con el Hospital Materno Infantil (HMI) del ISSEMYM (39). En dichos documentos se plasmaron los compromisos de cada institución para la procuración del tejido, procesamiento, esterilización y distribución (39). Debido a problemáticas para localizar a las donadoras para efectuarles una segunda serología, el ISSEMYM suspendió el abastecimiento de los amnios, fue entonces que en 2007 el I.N.I.N firmó un acuerdo de colaboración con el Instituto de Salud del Estado (ISEM) y a través del Centro Estatal de Trasplantes del Estado de México, se han estado procesando amnios procedentes del ISEM, principalmente del Hospital Ecatepec de las Américas. El hospital proveedor de amnios es responsable básicamente de:

1.- Selección de la donadora: aplicando criterios de inclusión, exclusión e historia clínica, Estos son : madre y producto sanos, sin sufrimiento fetal ni ruptura prematura de membranas y resultados negativos de serología. Se excluyen personas con antecedentes de promiscuidad sexual, prostitución, con tatuajes, verrugas o que hayan estado en prisión.

2.- Obtención del consentimiento escrito para usar el amnios y autorizar la serología.

3.- Realización de la serología de la donadora potencial, es decir se realizan exámenes de laboratorio destinados a detectar antígenos o anticuerpos en el suero sanguíneo para la detección de: HBsAg, antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, virus de la hepatitis C, VDRL, Treponema pallidum causante de sífilis, HIV, virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2. Si se usan técnicas de

biología molecular, los exámenes se realizan una sola vez, con la ventaja de que no habría que esperar 6 meses para efectuar una segunda serología.

4.- Procuración del amnios

5.- Limpieza preliminar, para la eliminación de restos placentarios, sangre, etc.

6.- Almacenamiento temporal a temperatura de refrigeración.

Posteriormente se transporta el tejido al BTR para su procesamiento, que incluye las etapas de:

1.- Lavado, utilizando una solución salina, hipoclorito de sodio y agua estéril, para disminuir la carga microbiana inicial.

2.- Extendido y secado en campana de flujo laminar, para disminuir el contenido de la humedad del tejido.

3.- Corte a diferentes tamaños según sea el uso, por ejemplo para aplicaciones en oftalmología se necesitan porciones de 4 x 4 cm, y para quemaduras extensas en un paciente adulto se necesitan de 10 x 20 cm o mayores.

4.- Empaquetamiento, el primario es la bolsa de papel/plástico; para el empaque secundario se utiliza una bolsa de polietileno para garantizar la integridad del empaque primario durante la manipulación.

5.- Etiquetado, indicando los datos del banco, tipo de tejido, dimensiones, fecha de caducidad, instrucciones de manipulación.

6.- Esterilización con radiación gamma, generalmente se solicita una dosis mínima de 25 kGy, o la indicada en el resultado del control microbiológico.

7.- Almacenamiento en espera de resultados de pruebas de esterilidad y segunda serología.

8.- Distribución a los hospitales, preferentemente a los del sector público.

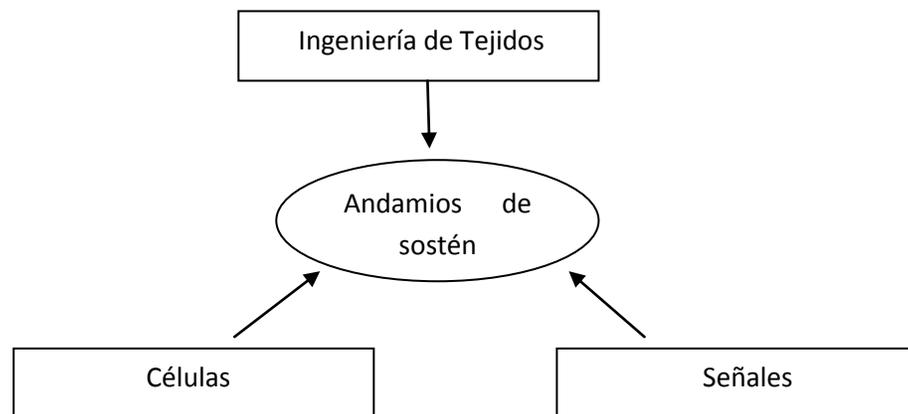
9.- Control microbiológico antes después de irradiado el tejido.

Las aplicaciones clínicas del amnios en el caso de México, gracias al trabajo del banco de tejidos del I.N.I.N ha permitido a cirujanos plásticos, ortopédicos y oftalmólogos de varios

hospitales del sector público y privado, principalmente en México D.F y Toluca, Mex. familiarizarse con el uso de ésta nueva técnica.

La ingeniería de tejidos es un área multidisciplinaria en la que se combinan las ciencias biológicas y de materiales para la generación de sustitutos biológicos que regeneren, restituyan o mantengan la función tisular. Los principales componentes de la ingeniería de tejidos son, las células, los andamios o polímeros de sostén y los factores de crecimiento (Vacanti y Langer 1999. Lancet).

Componentes de Ingeniería de Tejidos:



Uno de los principales componentes de los andamios naturales (en el que la matriz extracelular es organizada en los tejidos reales) son los biopolímeros de colágeno, principalmente en forma de fibras y fibrillas. Otras formas de organización como los geles, espumas y membranas también se han utilizado para la generación de sustitutos mediante ingeniería de tejidos. Varias de las formas pueden ser combinadas en el laboratorio para crear imitaciones de organización de biopolímeros en tejidos específicos. Los andamios también pueden ser enriquecidos con moléculas de señalización, las cuáles pueden estar vinculadas a ellos ó infundidos dentro de ellos.

La incorporación de células en el tejido protésico reconstituido a menudo puede proporcionar las señales necesarias para su reparación, pero el repertorio de estas señales puede estar limitado. (58)

El impulso para mejorar productos de ingeniería puede estar naturalmente guiado por el ideal, representados por el éxito evolutivo, la estructura y la función de la parte del cuerpo actual.

Es de esperar que en una industria en crecimiento se tenga una importante fuerza en la carrera para imitar la naturaleza con fidelidad. (58)

La amplitud de posibilidades para la creación de partes sustitutas fue explorado muy tempranamente en el crecimiento de la ingeniería de tejidos como disciplina. La reconstrucción de tejidos vivos fue reportada entre 1979 y 1986 por E.Bell y colaboradores. (58)

Justificación

En la actualidad las técnicas empleadas para el tratamiento de las lesiones corneales utilizan limbos donados ó células de ojos sanos, sin embargo el desabasto de tejidos y la baja celularidad hace necesario la expansión celular y su uso para la generación de sustitutos biológicos para reparar lesiones de la córnea. Mediante el empleo de un soporte a base de MAHR-cobalto-60 (^{60}Co) y células limbocorneales *in vitro*, y el uso de los remanentes de los casquetes corneales que se utilizan para diversos procedimientos quirúrgicos se pretende desarrollar un sustituto biológico que promueva la proliferación y diferenciación epitelial que potencialmente podría ser utilizado en el tratamiento de lesiones corneales que permitan en un futuro al paciente tener una mejor calidad de vida.

Hipótesis

La MAHR utilizada como andamio para las células del limbo corneal mantiene su viabilidad y promueve su diferenciación , así como la transición de células progenitoras a tejido corneal epitelial.

Objetivos

Objetivo general:

Valorar si la membrana amniótica humana radioesterilizada con radiación gamma del cobalto-60 (^{60}Co) (MAHR) es un sustituto que permita que las células troncales presentes en el limbo corneal se diferencien. Determinar la viabilidad de los remanentes de tejido limbocorneal en el medio de preservación Optisol-GS® mantenidos a diferentes tiempos de almacenamiento. Establecer el tiempo de cultivo de las células del limbo corneal a diferentes pases para la obtención de células epiteliales diferenciadas. Estudiar el fenotipo celular de las células del limbo cultivadas en una Membrana Amniótica Humana Radiesterilizada con cobalto 60 (^{60}Co) (MAHR).

Objetivos Particulares:

1. Aislar las células procedentes del limbo corneal (CLC).
2. Determinar el fenotipo celular mediante la técnica de Citometría de Flujo
3. Análisis indirecto de adhesión celular mediante tinciones histoquímicas.
4. Caracterizar las células (CLC) por su inmunofenotipo utilizando marcadores para células epiteliales y troncales al ser cultivadas sobre la MAHR.

Metodología

Recolección de muestra

Se obtuvieron 21 muestras donadas de limbo corneal de los remanentes de cirugía de trasplante de córnea realizadas en el departamento de Cornea y Cirugía Refractiva del Hospital General de México (previo consentimiento informado del Banco de Corneas). Los tejidos fueron transportados a la Unidad de Ingeniería de tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación, I.N.R., en medio (Busch & Lomb Cat. 50006-OPT) dentro de una hielera manteniendo la temperatura a 4°C.



Figura 6. Imágenes del tejido de limbo corneal en medio Optisol-GS®. Imagen tomada en el laboratorio de la Unidad de Ingeniería de tejidos, Terapia celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Procesamiento de muestra

Fue preparada para su procesamiento bajo condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo (Thermo Electron Corporation modelo 1284 serie 101783) (Fig. 7). Una vez dentro de la campana de flujo la muestra fue colocada sobre una caja petri desechable adicionándole 5ml de PBS (GIBCO 1X Ref. 10010-023 500 ml) (Fig. 7). Con ayuda de dos navajas de bisturí Braun número 21 se cortó la muestra en varios fragmentos, los cuáles fueron colocados dentro de un tubo de ensaye de 50 ml (Tubos de ensaye Corning Cat. 430897) conteniendo 10 ml de medio RPMI y 150 μ l de colagenasa tipo I (Worthington Biochemical Corporation).

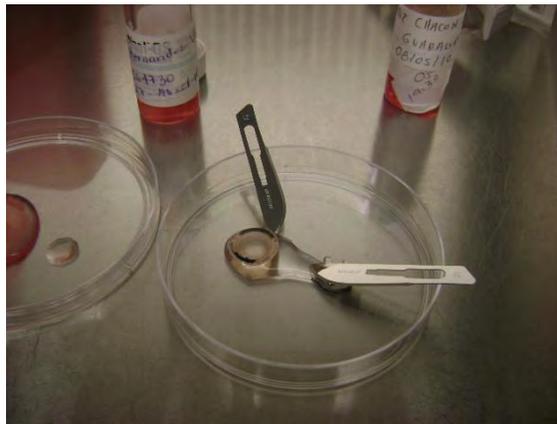


Fig. 7. Fotografía del tejido de limbo corneal sobre una caja petri en 5ml de PBS. Imagen tomada en el laboratorio de la Unidad de Ingeniería de tejidos, Terapia celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Una vez colocados los fragmentos de la muestra dentro del tubo de ensaye se trasladaron hacia donde se encuentra el agitador orbital (Orbital Shaker Incubator marca: mrc, modelo: TU-400), la muestra estuvo en agitación por un periodo de dos horas a 37°C y 2000 r.p.m. (proceso denominado digestión enzimática). Al finalizar el periodo de tiempo en agitación, el tubo de ensaye se colocó en una centrífuga (Centrifuge 581012 marca: eppendorf, modelo: 58102) durante 6 minutos a 1500 r.p.m., para obtener un botón celular (figura 8A).

Al terminar la centrifugación, el tubo de ensaye fue trasladado nuevamente hacia la campana de flujo. El botón celular fue homogenizado y se le adicionó 1 ml de medio DMEM/F12 (GIBCO Cat. 11330-032) + 10% suero fetal bovino (GIBCO Cat. 16000-044) + 1% Antibiótico antimicótico (GIBCO Cat.15240-062); (medio DMEM/F12 preparado) (figura 8B).

Cuantificación Celular

Se tomaron con una micropipeta (Pipet•life Rainin) 10 μ l del botón celular en medio DMEM/F12 preparado y 10 μ l del colorante azul tripano (GIBCO cat. 15250-061), colocando ambos en una placa de 96 pozos agitándolos con la misma punta de la micropipeta, se tomaron 10 μ l de dicha suspensión en el pozo y se colocaron en la celda de una cámara de Neubauer, colocando ésta bajo el microscopio óptico se contó el número de células por cuadrante, el número de células en suspensión se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\boxed{x} \cdot 2 \cdot 10.000 \cdot 1 = \text{Total de células}$$

Donde:

\boxed{x} : Número total de células que se observan por cuadrante de la cámara de Neubauer

2 : Adición de azul tripano

10.000 : Constante de la cámara de Neubauer

1 : Volumen en el que se disuelven

Cultivo Celular

Una vez determinada la cantidad de células en suspensión, dentro de una campana de flujo laminar, las células se cultivaron en una caja de cultivo de 25cm² adicionándole 5mL de medio DMEM/F12 preparado, manteniendo condiciones de esterilidad, las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO², y 95% de humedad. Al alcanzar el 100% de confluencia las células fueron separadas de la caja de cultivo utilizando EDTA [53mM] al 2.5% tripsina (GIBCO Cat. 25200), para poder llevar a cabo los siguientes procedimientos: análisis del fenotipo mediante citometría de flujo y expresión de proteínas por medio de inmunohistoquímica.

Del total de células contadas en el procedimiento anterior se restan 250 mil células ya que éstas son las utilizadas en la técnica de citometría. El resto se divide entre los 8 pozos en donde se realizará el cultivo celular sobre la membrana amniótica humana radioesterilizada, se utilizarán 400,000 células para el cultivo celular sobre la MAHR, repartidas en 50,000 células en 8 pozos de una placa de 96 pozos. El botón celular sigue en el tubo de ensayo de 50 ml CORNING, con una micropipeta se toma la cantidad de células que se utilizarán en la técnica de citometría de flujo y se

colocan en 5 tubos para citómetro diferentes. El resto se dejará por lo mientras en el tubo de ensaye de 50ml dentro de la campana de flujo.

Dentro de la campana de flujo laminar, se toma el empaque de papel que contiene en su interior una bolsa de PE (empaque secundario) el cual a su vez contiene un empaque de plástico grado médico (empaque primario) en el cual se encuentra la MAHR, se abre con mucho cuidado y se anotan los datos de la fecha de caducidad de la membrana en la bitácora, una vez abierta la bolsa, con unas pinzas de disección sin dientes de punta delgada se toma la membrana y se coloca dentro de una caja de petri de vidrio estéril, con ayuda de la pinza de disección y unas tijeras de disección se corta un fragmento de 1cm^2 de la membrana, el resto se guarda en la bolsa para esterilizar por radiación gamma y se cierra para mantener el campo estéril de la membrana. El fragmento cortado de la MAHR permanece en la caja de petri y es ahí donde se fragmentará en 8 segmentos. La MAHR está soportada en una tela de poliéster, de la cual se debe separar antes de que se coloque en los pozos de la placa de 96. Para colocar la MAHR en los pozos de la placa de 96, se toma con las pinzas de disección sin dientes de punta delgada y con cuidado se coloca en el pozo de la placa, una vez colocados los fragmentos de la MAHR en los pozos de la placa, se colocan 50, 000 células con una micropipeta sobre la MAHR, incubando 48 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO_2 , y 95% de humedad (cultivo primario).

Transcurrido el tiempo en incubación, y dentro de una campana de flujo, se retiró el medio de los pozos de la placa de 96 y se colocaron 200 μl de medio DMEM/F12 preparado en cada uno de los pozos. La placa de 96 pozos se revisó bajo el microscopio cada dos días las primeras dos semanas en cultivo y diariamente a partir de la tercera semana, así como también se realizó a la par el cambio de medio dentro de la campana de flujo.

Viabilidad celular.

Para comprobar que el pozo ha alcanzado el 100% de confluencia, se adiciona calceína al pozo, la calceína es un reactivo que posee una actividad fluorescente desarrollada sólo cuando hay actividad metabólica de las células vivas (96) y se hace una observación bajo el microscopio invertido, de fluorescencia. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: en la campana de flujo a los pozos de la placa de 96 que contienen la MAHR, se les retira el medio DMEM/F12 completo y se les adiciona 150 μ l de medio RPMI + 0.075 μ l de calceína, se deja incubar a 37°C en una atmosfera de 5% de CO², y 95% de humedad durante 1 hora, después del tiempo de incubación la placa de 96 pozos puede ser observada bajo el microscopio de fluorescencia, y se podrá ver si ya se alcanzó el 100% de confluencia y que porcentaje estaban vivas.



Figura 8. Membrana amniótica humana radioesterilizada (MAHR), en una caja de petri estéril, dentro de la campana de flujo laminar.

Citometría de Flujo

La Citometría de flujo es una tecnología que nos permite la medición simultánea de las características físicas de múltiples partículas individuales, usualmente células. Cuando se hace pasar individualmente y por medio de un flujo hidrodinámico, ante la incidencia de un rayo laser, la información que puede ser obtenida con respecto a una célula usando la Citometría de flujo incluye: su tamaño relativo (dispersión frontal fcs: forward scatter) su granularidad o complejidad interna (dispersión lateral ssc: side scatter) y su intensidad de fluorescencia relativa (fl1, fl2 y fl3)

Se colocaron 50 mil células del cultivo primario por tubo de ensaye y se les adicionaron con ayuda de una micropipeta de 10 μ l, 5 μ l de anticuerpos monoclonales conteniendo el panel mostrado en la siguiente tabla:

Tubo de ensaye	Panel de anticuerpos
1	Autofluorescencia
2	CD47/CD73/CD14
3	CD90/CD73/CD117
4	CD47/CD34/CD117
5	CD90/CD34/CD14.

Tabla 1: Panel de anticuerpos monoclonales utilizados para la técnica de Citometría de flujo. La autofluorescencia mencionada en el tubo 1, no lleva ningún anticuerpo en su interior (control). La clona y la marca del anticuerpo así como el fluorocromo al que estaban acoplados se muestra en la tabla 1 del anexo.

Después de ser colocados los anticuerpos en las muestras encontradas en los tubos de ensaye, se colocó parafilm en la parte superior y se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos.

Inmunohistoquímica

La técnica de Inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (97).

Reactivo	ml
PFA 1%*	200µl por pozo ó 1.6 ml por caja
PBS 1X	50ml
Peroxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) al 3%*	2ml
Anticuerpo primario (PBA+ Ac 1rio; 1:50)*	1.6 ml
PBS/tritón	50ml
Anticuerpo secundario (PBA+ Ac 2rio; 1:50)*	1.6 ml
Reactivo A+B*	1.6ml
Dako Cytomation Liquid DAB+Substrate Chromogen System *	1.6ml
PBA (Solución de bloqueo)*	
Hematoxilina	0.5 ml
Agua Amoniacal	0.5 ml
Agua destilada	1.6 ml
Agua de la llave	0.5 ml

Tabla2: Reactivos utilizados en la técnica de Inmunohistoquímica para células de limbo corneal sobre membrana amniótica humana radioesterilizada (MAHR) , las cantidades presentadas en ésta tabla son las totales para 8 pozos de una caja de 96. (*) Reactivos que necesitan estar en refrigeración, a 4°C.

Fijación

Como primer paso se retiró el medio DMEM/F12 preparado de los pozos de la placa de 96, para poder adicionar 200µl de PFA al 1% en cada pozo, una vez que se adicionó el PFA, la placa de 96 pozos se colocó en refrigeración a 4°C durante 5 minutos.

Transcurridos los 5 minutos, se sacó de refrigeración y se colocó sobre un campo limpio, el PFA al 1% se retiró de los pozos con ayuda de una micropipeta de 200 µl, una vez retirado el PFA, se colocaron 200 µl de PBS 1X durante 3 minutos 2 veces para evitar que quedaran residuos de PFA en el constructo. Sobre la tapa de la placa de 96 pozos se escribió con plumón indeleble el nombre del marcador que se colocó en el pozo durante la técnica y el número de muestra que fue, a un lado de la placa.

Oxidación endógena y bloqueo

Los pozos de la placa de 96 fueron enjuagados con PBS 1X, retirando el PBS de los pozos con una micropipeta. La placa de 96 pozos se cubrió con papel aluminio y se adicionaron 200 µl de H₂O₂ al 3 % en cada pozo donde se encuentra un constructo, manteniéndose en refrigeración durante 10 minutos, una sola vez. Transcurridos los diez minutos, la placa de 96 se retiró del refrigerador y se colocó sobre el campo limpio. Una vez en el campo se sustrae con la micropipeta el peróxido de hidrógeno para poder lavar los pozos con PBS durante tres minutos una vez, este paso es para evitar que hayan quedado residuos de H₂O₂. Una vez enjuagados los pozos, se colocaron 200 µl de solución de bloqueo (PBA) en los pozos que contienen el constructo, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Este paso se realizó para bloquear cualquier actividad endógena que se pudiera encontrar en el constructo por la peroxidasa.

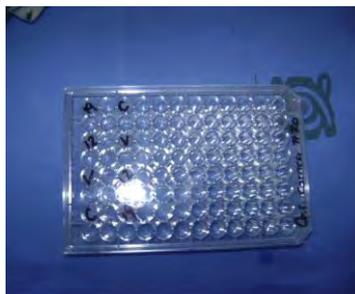


Figura 9. Placa de 96 pozos, escrito sobre su tapa con plumón indeleble el nombre del marcador que se va a colocar en el pozo durante la técnica.

Inmunoreacción

Después del paso de bloqueo, se retiró el PBA de los pozos y se les adicionó PBS 3 veces, no se dejó más que un breve momento solo para enjuagar el pozo.

El siguiente paso fue quitar el PBS totalmente de los pozos, ya que se adicionarían 150µl de anticuerpo primario, el anticuerpo primario solo se colocará en los pozos que estén marcados con:

V: vimentina; 12: citoqueratina 12; 19: citoqueratina 19.

Los pozos controles fueron marcados con una C, estos llevaron 150 µl de solución de bloqueo PBA, en lugar del anticuerpo primario. La placa de 96 pozos se cubrió con gasas húmedas y papel aluminio formando una cámara húmeda, manteniéndose en refrigeración a 4°C hasta el día siguiente.

Una vez transcurrido el tiempo en refrigeración del anticuerpo primario, la placa de 96 pozos se sacó de refrigeración, se quitó la cámara húmeda así como el anticuerpo primario y PBA de los pozos con el constructo. El siguiente paso fue enjuagar los pozos con PBS/tritón 0.1% durante 3 minutos 4 veces, y después de enjuagados, se le adicionaron 150 µl de anticuerpo secundario a los mismos pozos que tuvieron el anticuerpo primario, y los pozos marcados como controles, se les adicionaron 200 µl de PBA. La placa de 96 pozos se volvió a colocar en una cámara húmeda para posteriormente mantenerla en un incubador a 37°C durante 2 horas.

Después del tiempo en incubación la placa de 96 se retiró del incubador para pasarla al campo limpio, se retiró la cámara húmeda, el anticuerpo secundario y PBA de los pozos con constructo. El siguiente paso es enjuagar los pozos con PBS/tritón 0.1% durante tres minutos una vez, posteriormente se retirará el PBS/tritón y se le adicionó el reactivo A+B, el cual se mantuvo en los pozos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se retiró el reactivo A+B de los pozos y se volvieron a enjuagar con PBS/tritón 0.1% durante tres minutos 4 veces. A continuación se retiró el PSB/tritón 0.1% y se le adicionó a los pozos 150 µl del reactivo Dako Cytomation Liquid DAB+Substrate Chromogen System*, el cual se mantuvo en los pozos de 5-20 minutos o hasta notar la reacción deseada, esta reacción provocó que algunos de los constructos se tornaran de un color marrón claro. Al obtener la reacción deseada o al haber transcurrido el tiempo, se retiró el reactivo Dako con cuidado, porque es altamente cancerígeno. Las puntas de micropipeta utilizadas para tomar el reactivo y quitarlo de los pozos se desecharon en un contenedor especial. Se

adicionó PBS a los pozos durante 3 minutos dos veces, para quitar cualquier residuo del reactivo anterior, los pozos se mantuvieron con PBS como paso final de la inmunoreacción.

Tinción

Se preparó la placa de porcelana para tinción, adicionando en la primera fila de pozos los reactivos a utilizar, en el primer pozo se colocaron 0.5 ml de hematoxilina, en el siguiente pozo agua amoniacal, en el último pozo de esa fila y en el primero de la siguiente se adicionaron 0.5 ml de agua de la llave. Ya preparada la placa de porcelana para tinción con los reactivos, se prosiguió con la técnica de Inmunohistoquímica en su parte para tinción.

Se retiró el PBS encontrado en los pozos de la placa de 96, y con una pinza de disección sin dientes de punta delgada se tomó con cuidado el constructo, se colocó en el pozo con hematoxilina de la placa de porcelana para tinción durante unos segundos, e inmediatamente después se pasó al pozo que contenía agua amoniacal igualmente por unos segundos para posteriormente pasarlo a los pozos que contenían agua de la llave. Después de pasar por el último pozo que contenía agua de la llave, se colocó el constructo nuevamente en la placa de 96 en un nuevo pozo con agua destilada.

Una vez terminado de teñir los constructos totales de la placa de 96, se continuó con el montaje de los constructos sobre un portaobjetos para su observación posterior bajo el microscopio

Resultados

Viabilidad de los remanentes de tejido limbocorneal

Se obtuvieron 21 muestras de remanentes de tejido limbocorneal donado del departamento de Cornea y Cirugía Refractiva del Hospital General de México (previo consentimiento informado) (Tabla 2). Con el fin de analizar la factibilidad de obtener células para cultivo a partir de los remanentes, se almacenaron los tejidos a diferentes tiempos, en mismo medio de preservación, siendo el promedio de días almacenado 12 días (Tabla 2).

De 21 muestras en medio Optisol® del 61% (14 remanentes) se obtuvieron células viables para su cultivo y expansión *in vitro*. De cinco muestras no se aislaron células vivas y el 9% (2 tejidos) estuvieron contaminadas de origen.

	Número de muestras en Optisol®
Viables	14
No viables	5
Contaminadas	2
Total	21

Tabla 3. Número de muestras de tejido limbocorneal viables, no viables y contaminadas.

El promedio de tiempo de almacenamiento de los tejidos no viables fue de 26 días, siendo el mayor número de días almacenados de 42 días (2 muestras) en el medio de almacenado.

La media de las edades de los pacientes donadores de las 21 muestras de tejido limbocorneal es de 40 años, de los cuales el 67% fue población masculina y el 33% femenina. En la tabla 4 se muestran las edades y género de los pacientes donadores del tejido.

Muestra	Edad	Género	Días en preservación en medio Optisol-GS ®
1	66	Masculino	8
2	27	Femenino	7
3	48	Femenino	10
4	57	Masculino	15
5	38	Masculino	8
6	48	Femenino	3
7	48	Femenino	3
8	44	Masculino	42
9	40	masculino	42
10	49	Masculino	10
11	49	masculino	10
12	55	masculino	7
13	17	masculino	8
14	55	masculino	20
15	47	Masculino	9
16	34	Femenino	13
17	34	Femenino	13
18	63	Femenino	7
19	57	Masculino	19
20	23	Masculino	2
21	36	masculino	5

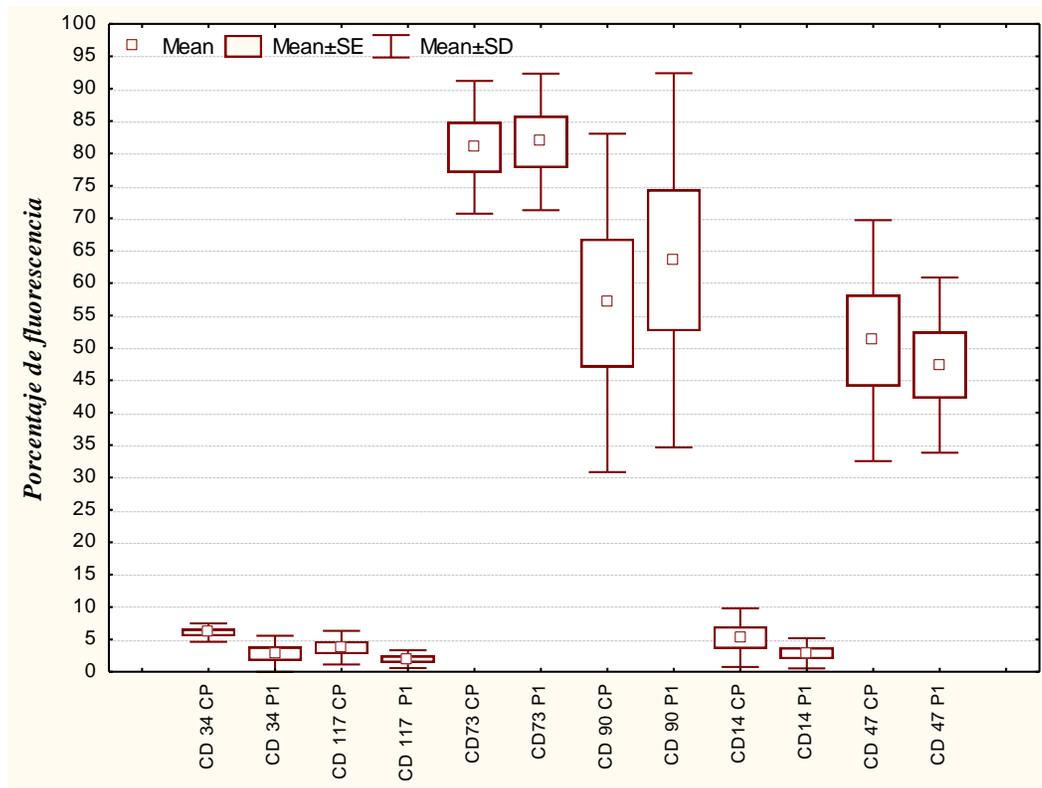
Tabla 4 Edades y género de los pacientes donadores de tejido limbocorneal

Fenotipo Celular

De las 21 muestras, al 33 % (7 muestras) se le realizó el análisis del fenotipo celular durante el cultivo primario y primer pase mediante la técnica de citometría de flujo, grafica (1). En la gráfica se observa la comparación de los diferentes marcadores para identificar el fenotipo celular durante cultivo primario y primer pase. Se puede observar que no se encontraron diferencias significativas en los antígenos de superficie evaluados entre el cultivo primario y el primer pase.

El CD14 descrito en el pigmento epitelial de la retina humana, así como también en macrófagos, monocitos y granulocitos (61, 62) se encontró principalmente en el cultivo primario (media 5%); el CD34 descrito en queratocitos estromales de la córnea (60), células endoteliales (60, 65), células progenitoras hematopoyéticas y monocitos (65, 66) y en sangre periférica y médula ósea (66) se encontró una población mayor en cultivo primario (media 6%) que en primer pase (media 3%); el CD47 descrito en eritrocitos, células hematopoyéticas, células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y mesenquimales (69, 79, 80, 81) así como en eritrocitos (67, 68, 69) se encontró que el 51% de las células en cultivo primario fueron positivas mientras que en el primer pase el 47% de la población fue positiva.

El CD73, descrito en células epiteliales (74,75), células endoteliales (79) y en la superficie de los linfocitos T y B (73,81,82) se encontró una población positiva en primer pase de 82% y en cultivo primario la población positiva fue de 81%; el CD 90 descrito en células progenitoras mesenquimales derivadas de médula ósea(71,79,83) se encontró en el 63%de las células en primer pase mientras que en cultivo primario fue de 57%; finalmente el CD117 descrito en células cardíacas, progenitoras hematopoyéticas, troncales neurales (16,79), células de la médula ósea, mastocitos y células mieloides leucémicas (78) fue positivo en el 4% de las células en cultivo primario, mientras que en primer pase fue de 2%.



Gráfica 1: Esta gráfica muestra la comparación entre los marcadores CD 14, 34, 117, 73, 90, 47 en cultivo primario (CP) y primer pase (P1). Se realizó una prueba de ANOVA con honestidad de Tukey. En la gráfica, el símbolo caracterizado con un cuadro pequeño (\square) representa la media, el símbolo caracterizado con un rectángulo grande (Π) representa la media \pm error estándar, y el símbolo caracterizado por una recta (\top) representa la media \pm la desviación estándar.

Viabilidad celular a la MAHR

La viabilidad de las células de los remanentes de limbo corneal sobre la MAHR fue determinada indirectamente con Calceína. Bajo el microscopio de fluorescencia se observó de manera cualitativa el 100 % de las células fluorescentes a la calceína.

De manera indirecta con esta misma técnica se evaluó la adherencia a la MAHR, encontrando que en el 100% de los remanentes limbocorneales viables se observó una confluencia del 100%.

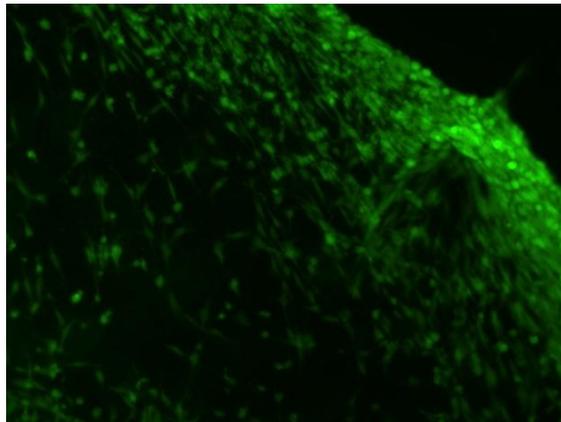


Figura 10: Imagen de las células limbocorneales sobre MAHR teñidas con calceína, cultivo primario.

Análisis de adhesión celular mediante tinciones histoquímicas

De la figura 11, en la imagen A se muestra la MAHR y las células adheridas a ésta, se puede distinguir un ligero relieve en forma de cuadro en el fondo de la imagen, dicho relieve es la forma que tiene la tela de poliéster que soporta a la MAHR en condiciones estériles y antes de ser utilizada. Sobre la membrana se observan los núcleos de las células del tejido limbo-corneal contrateñidos de color morado tenue con hematoxilina. En la figura B, se muestra la MAHR y las células adheridas a ésta marcadas con hematoxilina, donde se observan los mismos núcleos teñidos a mayor aumento (20X). En la figura C se pueden distinguir con mejor detalle (40X) las células limbo-cornales expandias *in vitro* y en las cuales se alcanzan a distinguir los nucléolos de algunas de éstas.

Aumento 10 X (a.n 0.3)

Aumento 20 X (a.n 0.5)

Aumento 40 X (a.n 0.75)

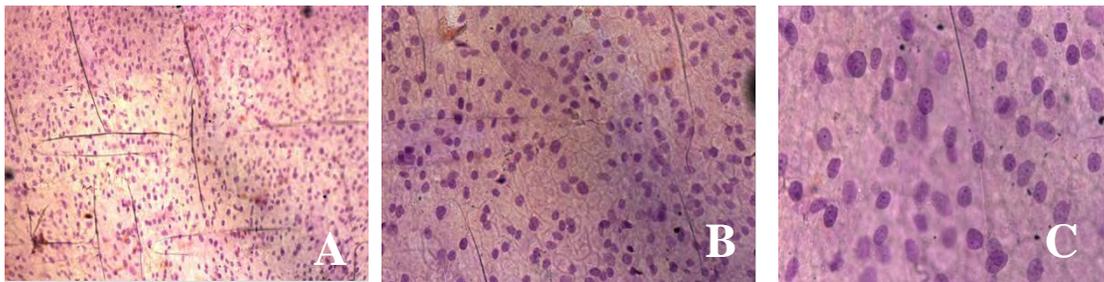


Figura 11: Imágenes de las células limbocorneales sobre la MAHR contrateñidas con hematoxilina mediante la técnica de Inmunohistoquímica

Caracterización de las células mediante su inmunofenotipo

La caracterización de las células por medio de su inmunofenotipo se realizó a través de la técnica de inmunohistoquímica en donde fueron utilizados los anticuerpos CK12, CK19 y vimentina. Los resultados se muestran en la figura 12, en donde encontramos el marcador utilizado, el aumento que se tuvo en cada una de las imágenes y apertura numérica del objetivo del microscopio óptico Carl Zeiss y las fotografías tomadas con el programa AxioVision Rel. 4.8

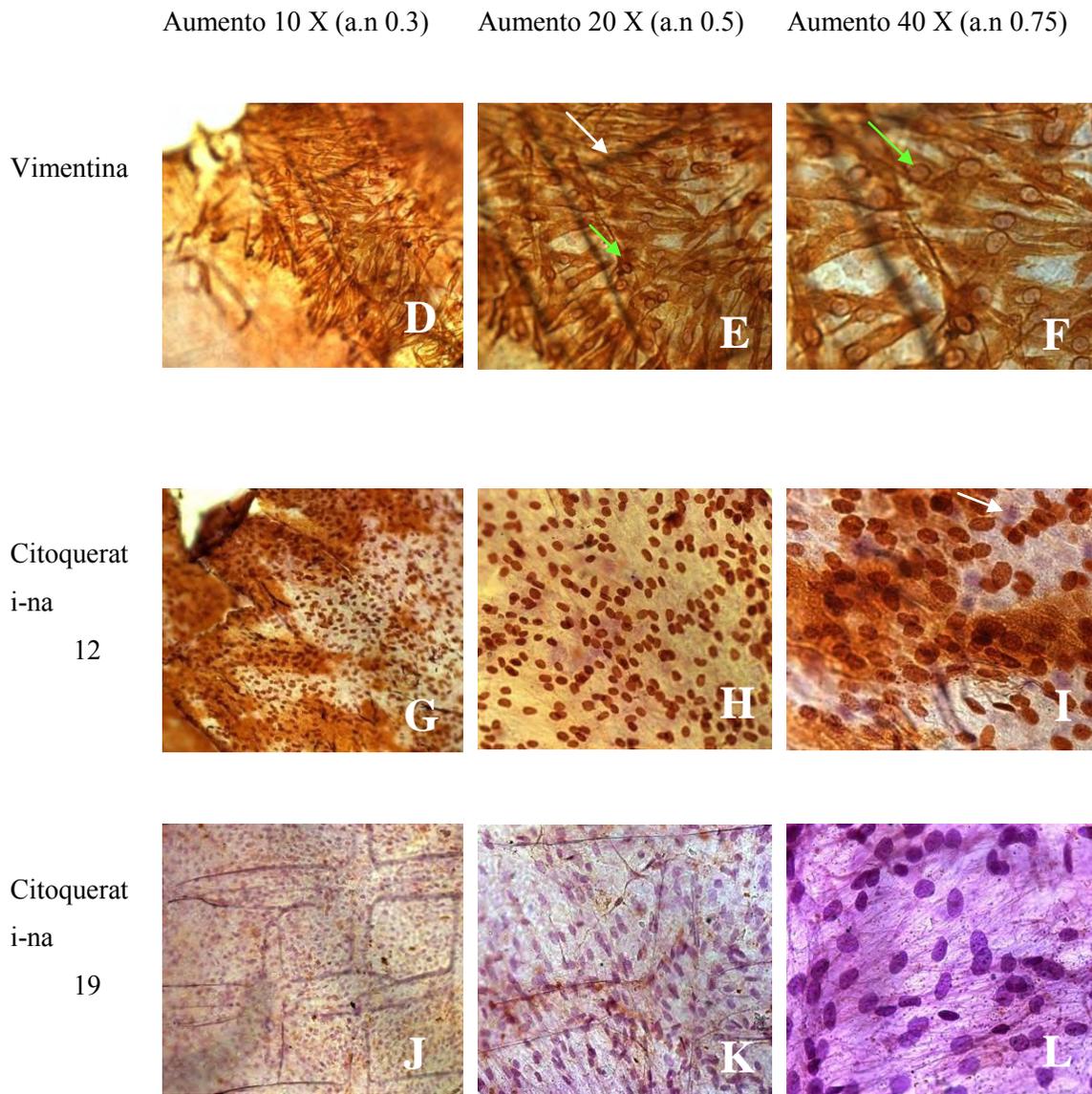


Figura 12. Microfotografías de las células limboconiales sobre la MAHR mediante la técnica de Inmunohistoquímica.

En la figura 12 D, se muestra la MAHR y las células del cultivo primario sobre ésta. Se pueden observar células alargadas adheridas a la membrana en un tono café que significa que son positivas a vimentina. En la figura E se observa con más claridad al fondo de la imagen el relieve de la tela de poliéster (flecha blanca) que soporta a la MAHR en condiciones estériles, así como también las células alargadas positivas a vimentina y con sus núcleos (flecha verde). En la figura F se observan a mayor aumento las células alargadas y positivas a vimentina en tono café y con núcleos bien definidos (flecha verde). Se alcanza a observar también que algunas de estas células se encuentran entrelazadas.

En la figura 12 G y H se distinguen las células adheridas a la membrana y positivas para citoqueratina 12, distinguiéndose los núcleos teñidos de color rojizo. En la figura I se muestra la MAHR y las células adheridas a ésta positivas con citoqueratina 12 con aumento de 40X, al centro de la imagen se observa una conglomeración de núcleos de color rojizo positivos a citoqueratina 12 y algunas otras células negativas (flecha blanca).

En la figura 12 J, al fondo de la imagen se observa un relieve bien definido de la malla adherida a la MAHR y en donde se puede observar un 100% de confluencia de las células al andamio. Se alcanzan a observar solamente pequeños núcleos teñidos de color morado tenue negativos a citoqueratina 19. En la figura 12 K y L se demuestra a mayor aumento la ausencia de esta proteína en los cultivos primarios de las células aisladas del tejido limbal.

Discusión

Las enfermedades de la superficie ocular pueden ser ocasionadas por múltiples padecimientos (86), como el síndrome de Steven –Jhonson, penfigoide ocular cicatrizal y daño corneal por quemaduras entre otros (1,2,3,5,8,9,15,16,22,28) originando disminución importante de la agudeza visual y afectan severamente a la población económicamente productiva de nuestro país. Por medio de la ingeniería de tejidos es viable el desarrollo de nuevos tratamientos mediante el empleo de un andamio de MAHR (38) como una membrana de sostén y que las células puedan proliferar promoviendo la reepitelización al mismo que mantengan el fenotipo celular, o pueda promover su diferenciación hacia el epitelio corneal. Por esta razón como un primer paso para implementar y desarrollar ésta tecnología en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación, este trabajo tuvo como objetivo, caracterizar las células procedentes del limbo corneal cultivadas sobre la MAHR. La importancia

del presente trabajo es que es el primer reporte del uso de la MAHR como un andamio para la expansión de células epiteliales del limbo corneal.

En el Hospital General de México el grupo de la doctora Leticia Vázquez-Maya utiliza la MAHR en las técnicas quirúrgicas realizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades oculares que afectan la visión del paciente, para promover la migración de células epiteliales de limbo y reparar las zonas dañadas de la superficie de la cornea, sin embargo la cantidad de corneas donadas en un momento dado podría limitar la capacidad de trasplante en los pacientes, por falta de donadores. Por lo que entre otro de los objetivos que se propusieron en esta tesis, fue determinar si los remanentes de los casquetes limbales podrían ser expandidos *in vitro* y mantener o inducir su diferenciación al ser cultivadas sobre la MAHR.

Como una estrategia para la preservación y el traslado de las muestras de limbo corneal a las instalaciones de la unidad de ingeniería de tejidos del INR procedentes del Hospital General de México se empleo el medio de preservación Optisol-GS ®, el medio más popular para almacenamiento corneal hasta por 14 días a 4°C (88, 89, 90). No obstante nosotros evaluamos el máximo tiempo de preservación con Optisol-GS ® y el alcance de la expansión celular y conservación del fenotipo limbal, para determinar el máximo tiempo de preservación en las condiciones ambientales en la Ciudad de México.

Las muestras de tejido analizadas en este trabajo tuvieron diferentes tiempos de preservación, desde 3 hasta 42 días. Los tejidos preservados desde 3 hasta 8 días fueron viables en cultivo, esto es que se procesaron y se sembraron obteniendo crecimiento celular en la caja de cultivo, hubo una excepción, una muestra que estuvo en preservación durante 10 días y también fue viable. Los resultados de la viabilidad del tejido en esta tesis utilizando el medio de preservación Optisol-GS ® difieren de lo citado en la bibliografía ya que según Lindstrom et al., (1992) y Means et al., (1995) la viabilidad de las células epiteliales del tejido preservado en medio Optisol-GS ® es de 2 semanas (14 días) y los resultados presentados en el presente trabajo indican que el tejido almacenado hasta 10 días como máximo produce células epiteliales viables para cultivo. Al igual sucede con la pérdida de viabilidad epitelial ya que Means y col. (1995) indica que ésta se pierde a partir de 67 días de almacenamiento en medio Optisol-GS ® y nuestras muestras almacenadas de entre 15 a 42 días ya no fueron viables en cultivo, lo que nos

muestra que las condiciones ambientales en la ciudad de México pudieran afectar la preservación y por ende la viabilidad de los tejidos, ya que el medio de preservación fue el mismo.

De las 21 muestras estudiadas, solo 2 (9%) estuvieron contaminadas desde su origen, es decir pudo haber sido alguna infección en el paciente, o en el momento de colocar el tejido en el medio Optisol-GS ® durante la cirugía. Por lo que el método de almacenamiento y envío de muestras a la UITTC del INR, fue el adecuado, y nos garantiza la posibilidad de expansión celular de los casquetes corneales. La edad promedio de los pacientes donadores de tejido fue de 40 años, siendo mayor el número de donadores del género masculino. La edad y género de los pacientes no influyó en los resultados de la viabilidad del tejido. Por ello se recomienda con base en nuestros resultados que los tejidos que vayan a ser procesados para cultivo celular deben permanecer en el medio de preservación desde su toma hasta 8 días después de ésta.

Una vez establecido que el tejido permanece viable durante su almacenamiento en el medio Optisol-GS ®, se prosiguió con la búsqueda de la población celular que conforma el tejido limbo corneal. El análisis del fenotipo celular, se llevo a cabo para examinar el tipo de población encontrada en el tejido limbo corneal, utilizando la técnica de Citometría de Flujo. En la mayoría de los trabajos utilizan ésta técnica para corroborar el fenotipo de células limbales, en nuestro caso además se determinó la población celular del tejido analizado. El grupo de trabajo de Mrugala y cols. (2007), es la única referencia que se encontró, y reportan la mayoría de los antígenos de superficie que nosotros utilizamos para la búsqueda de la población en el tejido limbo corneal y refieren que las células troncales mesenquimales expresan los marcadores CD73 y CD90 y son negativas a los marcadores CD14 y CD34. Leesa J. Deterding y col. (2011) determinaron los sitios específicos de la fosforilación *in vitro* e *in vivo* utilizando el marcador CD34, donde refieren que es un antígeno de superficie de células progenitoras hematopoyéticas, mientras que, Victor M. Elner y col. (2007) mediante la técnica de inmunohistoquímica investigaron la expresión funcional de este antígeno y refieren que es encontrado positivo en cultivos de pigmento epitelial de la retina humana. Mientras que en los trabajos de David J. Head y col. (2005), Schlossman SF y col. (1995), Kishimoto T y col. (1997), Barclay NA y col. 1997, Per-Arne Oldenborg y col. (2000), N. Ahrens y col. (2006), David J. Head y col. (2005) describen al CD47 como un antígeno de superficie presente en las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y mesenquimales y Sandy Gian Vascotto y col. (2006), Schlossman y col. (1995) al antígeno de superficie CD117 como positivos a células cardiacas, progenitoras hematopoyéticas, troncales neurales. Ninguno de los trabajos antes

citados muestran el porcentaje de las poblaciones en los tejidos analizados, por lo tanto solo nos sirven como referencia para saber qué población de células está positiva en el tejido limbo corneal. Nuestro datos respecto a CD90 y CD73 como marcador para células mesenquimales concuerdan con lo reportado con Mrugala y col. (2009), en lo que se refiere al CD47 la mitad de nuestra población fue positiva y no se encontró ningún trabajo que reporte este marcador epitelial en el limbo por lo que esta tesis también contribuye en el conocimiento para determinar el fenotipo celular en una población aislada del limbo corneal.

Las células epiteliales es la población celular que se busca expandir sobre la MAHR, primero porque la población epitelial en la superficie ocular es necesaria para una buena visión (Ken-ichi Endo y col. (2004) , Federico Castro-Muñozledo y col. (2008)), además de que el cultivo de células epiteliales de limbo son capaces de restaurar la superficie corneal en pacientes con una completa deficiencia limbal (D. Ghouby-Benallaoua y col. (2011)) y segundo porque diversos estudios han demostrado que el trasplante de membrana amniótica facilita la reepitelización y reduce la inflamación, vascularización, cicatrización corneal así como también posee propiedades antimicrobiales y antivirales (Rocío C. Gutiérrez y col. 2004; Andri K. Riau y col. 2010). El grupo de Edward Cotlier *et al.*, 2003 trabajó con epitelio desvitalizado de la membrana amniótica preservada y sugirieron que éste andamio es necesario para ayudar a expandir las células del epitelio limbal humano, manteniendo una diferencia menor en el fenotipo epitelial comparado con el epitelio basal del limbo *in vivo*, trabajo comparado con lo que hicieron Grueterich M. y col. (2002) al utilizar una membrana amniótica intacta desvitalizada de células epiteliales amnióticas, y Koizumi et al., al expandir células epiteliales limbales y de córnea de conejos, sobre una membrana amniótica desnuda, de lo cual se concluyó que ésta última es más adecuada para mantener el crecimiento de las células epiteliales corneales.

Otros trabajos muestran el uso de una membrana amniótica criopreservada como andamio para el crecimiento celular, como el realizado por el grupo de Boris V. Stanzel y col. (2005), quienes demostraron que la membrana criopreservada puede utilizarse como un sostén para promover el crecimiento y diferenciación de células de epitelio de pigmento retinal. Como puede observarse hay muchas formas de membrana amniótica que son utilizadas principalmente como andamio para expansión de células epiteliales y que mantengan su fenotipo, aunque también son utilizadas *in vivo* para facilitar una rápida cicatrización epitelial y reducir la inflamación y cicatrización de la superficie ocular como lo sugiere el grupo de Elizabeth Shay, BS y col. (2009). En el presente trabajo se utilizó una MAHR, la cual ofrece una mayor ventaja sobre las ya

mencionadas como lo es, a) Apropiaada seguridad: control de donantes, un nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6} , b) Fácil manejo y almacenamiento a temperatura ambiente c) Bajo costo d) Translúcido, que permite una fácil examinación clínica de la evolución de la córnea (40,41) y además es un excelente andamio para el sostén, crecimiento y expansión de las células epiteliales de limbo corneal manteniendo su fenotipo.

Una vez expandidas las células epiteliales sobre la MAHR, con ayuda del reactivo calceína se observó indirectamente su viabilidad sobre el andamio. De los trabajos consultados en la literatura, Patrick Decherchi y col. (1997) menciona a la calceína combinada con un homodimero de etidio para observar la viabilidad de las células de Schwann en los nervios después del procedimiento de criopreservación. Es el único trabajo encontrado en donde la calceína es utilizada como un marcador indirecto de viabilidad celular. En el presente trabajo, se contribuye con la determinación de la viabilidad de las células de los remanentes de limbo corneal sobre la MAHR indirectamente con calceína.

Confirmada la adhesión sobre la MAHR de células, se prosiguió con la caracterización de las células mediante su inmunofenotipo. Chen CYW y col. (1994) muestran en sus estudios que el fenotipo epitelial ha manifestado que el epitelio basal del limbo no expresa la queratina epitelial corneal específica, que es la CK12 y los experimentos de Pauklin y col. (2009) indican que una conjuntiva normal no presenta tinción de la CK12, pero sí de CK19. Por su parte el grupo de Úrsula Schlotzer-Schrehardt y col. (2005) notaron que la CK12 es un marcador para fenotipo epitelial corneal el cuál no se expresa en las células basales del epitelio limbal. Gabriel García Luna-Baca y col. (2007) realizaron cultivos de células epiteliales de limbo humanas *in vitro*, utilizando CK12, CK19 y vimentina, de los cuáles, sus resultados dieron positivos a CK19 y vimentina y negativos para CK12. En la presente tesis, las células cultivadas en cajas T75 no se les realizaron pruebas de inmunohistoquímica, estas pruebas se realizaron en las células sobre la MAHR, por tal motivo podría pensarse que en la MAHR influye en la diferenciación de las células epiteliales de limbo hacia células epiteliales de córnea, y por eso se obtuvo un inmunofenotipo positivo a CK12 y vimentina y negativo para CK19.

Conclusión

Fue posible el cultivo de células epiteliales de limbo corneal sobre MAHR. La viabilidad de los remanentes de tejido limbocorneal preservados en medio Optisol-GS es de 1- 8 días, para poder establecer un cultivo de células del tejido limbo corneal. Durante el cultivo primario y pase uno, las células de tejido limbocorneal mantienen su fenotipo celular. El tejido limbocorneal es un tejido óptimo para ser utilizado en la obtención de células progenitoras indiferenciadas y al ser sembradas sobre una membrana amniótica humana radioesterilizada con cobalto-60 (^{60}Co), la cual parece estar favoreciendo la maduración de las células progenitoras hacia células epiteliales, además de que ofrece ser un andamio con mayor seguridad biológica.

Bibliografía

1. Yasukata Hayashida, Kohji Nishida, Masayuki Yamato, Katsuhiko Watanabe, Naoyuki Maeda, Hitoshi Watanabe, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, Yasuo Tano. Ocular Surface Reconstruction Using Autologous Rabbit Oral Mucosal Epithelial Sheets Fabricate Ex Vivo on Temperature-Responsive Culture Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual. Science*. 2005. 46(5).
2. N. Kaizumi, S. Kinoshita. Ocular Surface Reconstruction, Amniotic Membrane, *And Cultivated Epithelial Cells From The Limbus*. *Ophthalmol.* 2003. 87(1437-1439).
3. Yanling Ma, Yongsheng Xu, Zhifeng Xiao, Wei Yang, Chun Zhang, E.Song, Yiqin Du, Lingsong Li. Reconstruction Of Chemical Burned Rat Corneal Surface By Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006. 24(315-321).
4. Rocío C. Gutierrez, Ashley Behrens, Olga De Marcucci, Hector Guaimare. Cultivo De Células Epiteliales Limbales En Membrana Amniótica Humana En El Tratamiento De Las Quemaduras Corneales Por Álcali. *Oftalmol.* 2004. 60(2).
5. Ray Jui-Fang, Lien-Min Li, Jan-Kan Chen. Reconstruction of Damage Corneas By Transplantation Of Autologous Limbal Epithelial Cells. *The New England Journal Of Medicine*. 2000. 343(2).
6. Yan Qing Zhang, Wen Jie Zhang, Wei Liu, Xiao Jie Hu, Guang Dong Zhou, Lei Cui, Yilin Cao. Tissue Engineering Of Corneal Stroma Layer With Dermal Fibroblast: Phenotypic And Functional Switch Of Differentiated Cells In Cornea. *Tissue Engineering*. 2007. 14(2).
7. Gabriel Andres Luna-Baca, Yonathan Garfias, Atzin Robles-Contreras, María Carmen Jimenez-Martínez. Caracterización Fenotípica De Células Epiteliales Limbales Humanas Expandidas In Vitro. *Gac. Med. Mex.* 2007. 143(3).
8. Kohji Nishida, Masayuki Yamato Hgb. Corneal Reconstruction with Tissue Engineering Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. *The New England Journal of Medicine*. 2004. 351(12).
9. In Keun Jang, Jae Il Ahn, Jun-Seop Shin, Young-Sam Kwon, Yan-Hwan Ryu, Jeong-Kyu Lee, Jung-Keug Park, Kye-Yong Song, Eun-Kyung Yang, Jae-Chan Kim. Transplantation of Reconstructed Corneal Layer Composed of Corneal Epithelium and Fibroblast on Lyophilized Amniotic Membrane To Severely Alkali-Burned Cornea. *Artificial Organs*. 2006. 30(6):424-431.
10. Ilse Claerhout, Hilde Beele, Dirk De Bacquer, Philippe Kestelyn. Factors Influencing The Decline in Endothelial Cell Density After Corneal Allograft Rejection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003. 44(11).
11. Alexander Schermer, Sharon Galvin, Tung-Tien Sun. Differentiation-Related Expression Of Major 64 Corneal Keratin In Vivo And In Culture Suggest Limbal Location Of Corneal Epithelial Stem Cells. *The Journal of Cell Biology*. 1986.

12. Xiaojie Hu, Wei Lui, Lei Cui, Min Wang, Yilin Cao. Tissue Engineering of Transparent Corneal Stroma. *Tissue Engineering*. 2005. 11(11/12).
13. Yang Qing Zhang, Wen Jie Zhang, Wei Liu, Xiau Jie Hu, Guang Dong Zhou, Lei Cui, Yilin Cao. Tissue Engineering Of Corneal Stroma Layer With Dermal Fibroblast: Phenotypic And Functional Switch Of Differentiated Cells In Cornea. *Tissue Engineering*. 2008.14(2).
14. Belmary Aragonés Cruz. Utilización De La Mebrana Amniótica Radioesterilizada En Cirugía De Pterigium. *Revista Cubana De Oftalmología*. 2006. 19(2).
15. Virender S. Sanwan, Himanshu P. Matalia, Greta K. Vemuganti, Ghazala Ifthekar, Anees Fatima, Shashi Sing, Gullapali N. Rao. Early Results of Penetrating Keratoplasty After Cultivated Limbal Epithelium Transplantation. *Clinical Science-Reinprented Arch Ophthalmol*. 2005. 123.
16. Sandy Gian Vascotto, May Griffith. Localization Of Candidate Stem And Progenitor Cell Markers Within The Human Cornea, Limbus, And Bulbar Conjunctiva In Vivo And In Cell Culture. *The Anatomical Record Part*. 2006. 288(921-931).
17. Teruo Nishida, Shigenori Nakagawa, Kiyoshi Watanabe, Kenneth M. Yamada, Toshifumi Otori, Michael B. Berman. A Peptide From Fibronectine Cell-Binding Domain Inhibits Attachment Of Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1988. 29(12).
18. Fatima A, Sangwan Vs, Iftekhar G, Reddy P., Matalia H, Balasubramanian D, Vemuganti Gk. Technique Of Cultivating Limbal Derived Corneal Epithelium On Human Amniotic Membrane For Clinical Transplantation. *J. Postgrad Med*. 2006. 52(4).
19. Edward G, Fey, Katherine M. Wan, Sheldon Penman. Epithelial Cytoskeletal Framework And Nuclear Matrix-Intermediate Filament Scaffold: Three-Dimensional Organization And Protein Composition. *The Journal Of Cell Biology*. 1984:98.
20. Satoshi Kawasaki, Hidetoshi Tanioka, Kenta Yamasaki, Norihiko Yokoi, Aoi Komuro, Shigeru Kinoshita. Clusters Of Corneal Epithelial Cells Reside Ectopically In Human Conjunctival Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual. Science*. 2006. 47 (4).
21. Grazyna Ziowska, Jia Shi, Gustavo Munguba, Moira R. Jackson, Roman Alpatov, Matthew N. Simons, Yujiang Shi, Stephen Sugrue. Pinin/Drs/Mema Interacts With Srp75, Srm300, And Srrp130 In Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003. 44(11).
22. Ken-Ichi Endo, Takahiro Nakamura, Satoshi Kawasaki, Shigeru Kinoshita. Porcine Corneal Epithelial Cells Consist Of High-And Low-Integrin α -1-expressing Populations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004. 45(11).

23. Garfias Y. , Linares M. , Suárez R., Sánchez-Navarro A., Jimenez-Martínez Mc. Características Inmunológicas De Las Células Epiteliales Limbales :Análisis In Vitro De La Función Del Tlr4. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2007. 82(95-102).
24. Andre C. Romano, Edgar M. Espana, Sonia H. Yoo, Murat T. Budak, J.Mario Wolosin, Scheffer C.G Tseng. Different Cell Sizes In Human Limbal And Central Corneal Basal Epithelia Measured By Confocal Microscopy And Flow Cytometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003. 44(12).
25. López-García J.S, Rivas L, García-Lozano I. Tratamiento De La Insuficiencia Limbal Grave Mediante Cirugía Combinada De Transplante De Limbo Y Transplante De Membrana Amniótica. *Sociedad Española De Oftalmología*. 2008.
26. Lei Qu, Xueyi Yang, Xin Wang, Ming Zhao, Shengli Mi, Zhongying Dou, Huayan Wang. Reconstruction Of Corneal Epithelium With Cryopreserved Corneal Limbal Stem Cells In A Rabbit Model. *The Veterinary Journal*. 2007.
27. Yutaka Ishino, Yoichiro Sano, Takahiro Nakamura, Che J. Connon, Helen Rigby, Nigel J. Fullwood, Shigeru Kinoshita. Amniotic Membrane As A Carrier For Cultivate Human Corneal Endothelial Cell Transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004. 45(3).
28. Yiqin Du, Jing Chen, James L. Funderburgh, Xian Zhu, Lingsong Li. Functional Reconstruction Of Rabbit Corneal Epithelium By Human Limbal Cells Cultured On Amniotic Membrane. *Molecular Vision*. 2003. 9(635-643).
29. Kazunari Higa, Shigeto Shimmura, Naoko Kato, Tesuya Kawakita, Hideyuki Miyashita, Yuji Itabashi, Keiichi Fukuda, Jun Shimazaki, Kazuo Tsubota. Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered With or Without an Amniotic Membrane Carrier. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007. 48(2): 597-604.
30. Danielle Meller, Vanesa Dabul, Scheffer C.G Tseng. Expansion of Conjunctival Progenitor Cells on Amniotic Membrane. *Exp. Eye Res*. 2002. 74: 537-545.
31. Virender S. Sangwan, Sanghamitra Burman, Sushma Tejwani, Sankaranarayana Pillai Mahesh, Ramesh Murthy. Amniotic Membrane Transplantation: A Review Of Current Indications In The Management Of Ophthalmic Disorders. *Ophthalmol*. 2007. 55: 251-260.
32. Virender S.Sangwan, Himanshu P. Matalia, Geeta K. Vemuganti, Anees Fatima, Ghazala Ifthekar, Shashi Singh, Rishita Nutheti, Gullapalli Rao. Clinical Outcome of Autologous Cultivated Limbal Epithelium Transplantation. *Indian J. Ophthalmol*. 2006. 54:29-34.
33. Ursula Schlotzer-Schrehardt, Friedrich E. Kruse. Identification And Characterization of Limbal Stem Cells. *Experimental Eye Research*. 2005. 81:247-264.

34. Sandra Papini, Rosellini A., Nardi M., Giannarini C., Revotella R.P. Selective growth and expresión of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture. *Differentiation*. 2005. 73: 61-68.
- 35.- Leslie P. Gartner, James L. Hiatt. *Texto Atlas de Histología*. 2002. Segunda edición, McGrawHill Interamericana Editores.
- 36.- Zhang Q., Zhao M., Hu K., Li H., Lu J., Quin Y. A comparative study on immunocompatibility and histological turnover after fresh or preserved human amniotic membrane xenotransplantation. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008 May;22(5):619-24
- 37.- Ley-Chavez E., Martínez-Pardo ME., Roman R., Oliveros-Lozano FdeJ., Canchola-Martínez E. Application of biological dressings from radiosterilized amnions with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant*. 2003;8(4):46-9.
- 38.- Leticia Vázquez-Maya, Marco Antonio Salazar-Escamilla, María Esther Martínez-Pardo. Use of amniotic membrane radiosterilized with cobalt-60 for reconstruction of ocular surface. *Revista Médica Del Hospital General De México*, S.S. Vol.72, Núm.1 Ene.-Mar.2009 pp 7 – 15.
- 39.- María Esther Martínez Pardo. Actividad científica y tecnológica en el Instituto Nacional de Investigaciones nucleares. Innovación editoriales lagares México. 2008
40. Martínez PME, Ley CE, Reyes FML, Rodríguez FP, Vázquez ML, Salazar EMA. *Radiat Phys Chem*. 2007; 76/11-12, 1771-1774.
41. Martínez PME, Reyes FML. The tissue bank at the National Nuclear Research Institute in Mexico. *Cell and Tissue Banking*. 2003; 4: 163-168.
- 42.- Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch. Ophthalmol*. 1940;23:522-5
43. Sorsby A., Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* .1946;30:337-45
44. Sorsby ., Haythorne J., Reed H. Further experience with amniotic membrane graft in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol*. 1947;31:409-18
45. Batle JF., Perdomo FJ. Placental membranes as a conjunctival substitute. *Ophthalmol*. 1993; 100-107.
46. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*. 1995; 14:473-84.

- 47 Michael H. Ross, Lynn J. Romrell, Gordon I. 1998. Kaye. *Histología Texto y Atlas a color*. Tercera edición. Editorial Panamericana
- 48 Tapio Ihanamäki, Lauri J. Pelliniemi, Eero Vourio. Collagens and collagen-related matrix components in the human and eye mouse. *Retinal and eye Research* 23 403-434. 2004.
- 49.- Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro. *Basic Histology text and Atlas*. 2005. Onceava edición. McGraw-Hill.
- 50.- Federico Castro-Muñozledo. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Experimental eye research* 86 (2008) 459-469.
- 51.- Shu-Xin Zhang. *An Atlas of Histology*. 1999. Editorial Springer, Nueva York.
- 52.- Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, Judy M. Sturn. *Temas Clave Biología Celular e Histología*. 2007. Quinta edición. Editorial Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins.
- 53.- Don W. Fawcett. *Tratado de Histología*. 1995. Duodécima edición. Editorial Interamericana-McGraw-Hill.
- 54.- Leon Weiss, Roy O. Greep. *Histología*. 1982. Cuarta edición editorial El Ateneo, España
- 55.- Sandra Papini, Alfredo Rosellini, Marco Nardi, Claudio Giannarini, Roberto P. Revotella. Selective growth and expansion of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture. *International Society of Differentiation* 2005. 73:61-68.
- 56.- Hyun-Seung Kim, Xim Jun Song, Cintia S. de Pavia, Zhuo Chen, Stephen C. Pflugfelder, De-Quan Li. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Experimental Research* 79 41-49 2004.
- 57.- Ken-ichi Endo, Takahiro Nakamura, Satoshi Kawasaki, Shigeru Kinoshita. Porcine Corneal epithelial cells consist of high- and low-integrin β 1- expressing populations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* November 2004 Vol. 45 No. 11.
- 58.- Robert P. Lazo, Robert Langer., Joseph Vacanti. *Principles of Tissue Engineering* 2nd edition, edit. Academy Press.
- 59.- Jenny Andrea Arévalo Romero. Bcl, Diana Marcela Páez Guerrero. Bcl Viviana Marcela Rodríguez Pardo. Bcl. MSc. *Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas*
- 60.- Magdalena Sosnova, Monika Bradi y John V. Forrester. CD34 Corneal Stroma cells are bone marrow-derived and express homopoietic stem cells markers. *Stem Cells* 2005; 23:507-515

- 61.- Victor M. Elner, Susan G. Elner , Zong-Mei Bian , Andrei L. Kindezelskii, Ayako Yoshida and Howard R. Petty. RPE CD14 Immunohistochemical, genetic, and functional expression
- 62.- Grace L. Su, Ken Dorko, Stephen C. Strom, Andreas K. Nüssler, and Stewart C. Wang. CD14 expression and production by human hepatocytes. *Journal of Hepatology* Volume 31, Issue 3, September 1999, Páginas 435-442
- 63.- Sandy Giant Vascotto and May Griffith. Localization of candidate stem progenitor cell markers within the human cornea, limbus and bulbar conjunctiva in vivo and in cell culture. *The anatomical Record part A* 288^a; 921-931 (2006)
64. Christine Schütt. CD14. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Volume 31, Issue 5, May 1999, Pages 545-549 Molecules in focus
- 65.- Leesa J. Deterding , Jason G. Williams, Margaret M. Humble, Robert M. Petrovich, Sung-Jen Wei, Carol S. Trempus, Matthew B. Gates, Feng Zhu Robert C. Smart, Raymond W. Tennant and Kenneth B Tomer. CD34 antigen: Determination of specific sites of phosphorylation *in vitro* and *in vivo* . *International Journal of Mass Spectrometry*
- 66.- T.L. Holyoake, M.J. Alcorn and I.M. Franklin. The CD34 antigen: Potential clinical advantages of CD34 selection. *Clinical Oncology* Volúmen 8, Issue 4, 1996, Páginas 214-221 Review article
- 67.- Per-Arne Oldenborg , Alex Zheleznyak, Yi-Fu Fang , Carl F. Lagenaur , Hattie D. Gresham and Frederik P. Lindberg. Role of CD47 as a Marker of Self on red blood Cells. DOI: 10.1126/scienceVol.288no.5473pp.2051-2054
- 68.- N. Ahrens, C. Pagenkopf,H. Kiesewetter, A. Salama. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia.Volúmen 16, Issue 6, paginas 397–402, Diciembre 2006
- 69.- David J. Head, Zoe E. Lee, Muhammed M. Swallah,Neil D. Avent. Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability *in vitro*. *British Journal of Hematology* Volúmen 130, Issue 5, páginas 788–790, Septiembre 2005
- 70.- A. Neil Barclay, Marion H. Brown, S.K. Alex Law, Andrew J. McKnight, Michael G. Tomlinson and P. Anton van der Merwe. CD47. *The Leucocyte Antigen FactsBook* 1997, Páginas 325-326.

- 71.- F. Mercati, L. Pascucci, P. Ceccarelli, C. Dall'Aglio, V. Pedini, A.M. Gargiulo. Expression of mesenchymal stem cell marker CD90 on dermal sheath cells of the anagen hair follicle in canine species. *European Journal of Histochemistry* 2009
- 72.- Zhen Fan Yang, David W. Ho , Michael N. Ng, Chi Keung Lau, Wan Ching Yu , Patricia Ngai, Patrick W.K. Chu, Chi Tat Lam, Ronnie T.P. Poon and Sheung Tat Fan. Significance of CD90⁺ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell* Volúmen 13, Issue 2, 5 Febrero 2008, Paginas 153-166
- 73.- Regina Resta and Linda F. Thompson. T Cell Signalling Through CD73. *Cellular Signalling* Volúmen 9, Issue 2, Febrero 1997, Páginas 131-139 Review.
- 74.- Jana KG Grünewald and Anne J Ridley. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *Journal of Inflammation* 2010
- 75.- A. Neil Barclay, Marion H. Brown, S.K. Alex Law, Andrew J. McKnight, Michael G. Tomlinson and P. Anton van der Merwe. CD73. *The Leucocyte Antigen FactsBook* 1997, Paginas 325-326.
- 76.- Li J, Luo SK, Zhang GC, Hong WD, Tong XZ. Expression of CD117 antigen on multiple myeloma and its significance. *Ai Zheng*. 2004 Agosto; 23(8):951-4.
- 78.- A. Neil Barclay, Marion H. Brown, S.K. Alex Law, Andrew J. McKnight, Michael G. Tomlinson and P. Anton van der Merwe . CD117. *The Leucocyte Antigen FactsBook* 1997, Páginas 394-396
- 79.- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, ed. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York: Oxford University Press; 1995
- 80.- Kishimoto T, von dem Borne AEG, Goyert SM, et al., ed. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. London: Garland Publishing; 1997
- 81.- Barclay NA, Brown MH, Birkeland ML, et al, ed. *The Leukocyte Antigen FactsBook*. San Diego, CA: Academic Press; 1997.(Biology)
- 82.- Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens*. 1990; 35(1):9-19
- 83.- Knapp W, Dorken B, et al, ed. *Leucocyte Typing IV*. New York: Oxford University Press; 1989.
- 84.- Susanne Pitz, Roland Moll . Intermediate-filament expression in ocular tissue. *Progress in Retinal and Eye Research*. Volúmen 21, Issue 2, Marzo 2002, Páginas 241-262

- 85.- I. Fon Bambang, Dan Lub, Huiping Li, Lily-Lily Chiu, Quek Choon Lau, Evelyn Koay, Daohai Zhang. Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. *Experimental Cell Research* 315 (2009) 1964–1974
86. Naresh Polisetty, Anees Fatima, Soundarya Lakshmi Madhira, Virender Singh Sangwan, Geeta K. Vemuganti. 2008. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Molecular Vision*. 14:431-442
- 87.- Moll R. Frankie, W.W. Schiller, D.L. Geiger B., Kepler R. The catalog of human cytoqueratins. Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
88. Lindstrom, R.L., Kaufman, H.E., Skelnik, D.L., Laing, R.A., Lass, J.H., Musch, D.C., Trousdale, M.D., Reinhart, W.J., Burris, T.E., Sugar, A., Davis, R.M., Hirokawa, K., Smith, T., Gordon, J.F. Optisol corneal storage medium. *American Journal of Ophthalmology* Volúmen 114, Issue 3, 1992, Páginas 345-356
89. Means, T.L., Geroski, D.H., Hadley, A., Lynn, M.J., Edelhauser, H.F. Viability of human corneal endothelium following optisol-GS storage. *Archives of Ophthalmology* Volúmen 113, Issue 6, 1995, Páginas 805-809
90. J. Szaflik, I. Liberek and M. Brix. Corneal storage methods. *Transplantation Proceedings* Volúmen 32, Issue 6, Septiembre 2000, paginas 1424-1425
91. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jan;43(1):63-71
- 92.-Boris V. Stanzel, Edgar M. Espana, Martin Grueterich, Tetsuya Kawakita, Jean-Marie Parel, Scheffer C.G. Tseng, Susanne Binder. Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelial cells in culture. *Experimental Eye Research* 80 (2005) 103–112
- 93.-Elizabeth Shay, Ahmad Kheirkhah, Lingyi Liang, Hossam Sheha, Darren G. Gregory and Scheffer C.G. Tseng. Amniotic Membrane Transplantation as a New Therapy for the Acute Ocular Manifestations of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis
- 94.- Patrick Decherchi, Philippe Cochard and Patrick Gauthier Dual staining assessment of Schwann cell viability within whole peripheral nerves using calcein-AM and ethidium homodimer *Journal of Neuroscience Methods* Volúmen 71, Issue 2, Febrero 1997, Páginas 205-213
- 95 Chen WYC, Mui M-M, Kao WWY. Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium, *Curr Eye Res* 1994; 13; 765-78

- 96.- Mikk Pauklin, Klaus-P., Daniel Meller. Characterization of corneal surface in limbal stem cell deficiency and after transplantation of cultivated limbal epithelium. *American academy of ophthalmology* 2009.
- 96.- S. Lledó., R. Alfonso y S.F Aliño. Antisense gene therapy using anti-k-ras and antitelomerase oligonucleotides in colorectal cancer. *Rev. Esp. enferm dig. (Madrid)* Vol. 97. N.º 7, pp. 472-480, 2005
- 97.- María Genoveva González Morán. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. AGT editor, 393 páginas.
- 97 : Eugenia Flores-Figueroa, Juan Jose Montesinos, Hector Mayani. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación clínica volumen 58 número 2* Artículo de revisión. 2006.
- 98.- Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res* 2003; 34:3-15
- 99.- Santiago René Anzaldúa Arce, María de Lourdes Juárez Mosqueda, Héctor Villaseñor Gaona, María Cristina Ríos Mas, Miguel Ángel Cornejo Cortés, Marco Antonio Meraz Ríos. Qué son las células troncales o “células madre”? *Vet. Méx.*, 38 (1) 2007
- 100.- Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL,, Coucouvanis E, Verfaillie. . Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004;22:531-543.
- 101 .- Dolly Macías Riveros, Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Rogelio Alonso Morales, Marco Cajero Juárez. Células madre y células troncoembrionarias: Diferencias biológicas. *Vet. Méx.*, 38 (4) 2007
- 102 .- Mike Boulton, Julie Albon. Stem cells in the eye. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004) 643–657
- 103 .- A. Fernández, J. Moreno, F. Prósper, M.García, J. Echeveste. Regeneración de la superficie ocular: *stem cells*/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales Sis. San Navarra* v.31 n.1 Pamplona . 2008.
- 104.- Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 1442-1443.
- 105.- Wilshaw, JN Kearney, J Fisher y E. Ingham. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering, *Tissue Eng.* 12 (2006), pp. 2117–2129.
- 106.- Niknejad, H Peirovi, M Jorjani, A Ahmadiani, J Ghanavi and AM. Seifalian. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering, *Eur. Cell Mater.* 15 (2008), pp. 88–99.

ANEXO

Tabla 1. Panel de marcadores utilizados en la técnica de Citometría de flujo.

Anticuerpo	Marca	Clona
CD14	BD Pharmigen™. Conjugado con APC-antihumano	MφP9
CD 34	BD Pharmigen™. Conjugado PE-antihumano	563
CD 47	BD Pharmigen™. Conjugado con FITC-antihumano	B6H12
CD 73	BD Pharmigen™. Conjugado PE-antihumano	AD2
CD 90	BD Pharmigen™. Conjugado con FITC-antihumano	5E10
CD 117	BD Pharmigen™. Conjugado con APC- antihumano	104D2

Pruebas estadísticas

Breakdown Table of Descriptive Statistics (ana cornea final)							
N=84 (No missing data in dep. var. list)							
Antígeno	Means	N	Std.Dev.	Variance	Std.Err.	Minimum	Maximum
CD 34 CP	6.04571	7	1.41484	2.002	0.53476	3.91000	7.67000
CD 34 P1	2.77571	7	2.78510	7.757	1.05267	0.27000	8.06000
CD 117 CP	3.73000	7	2.59109	6.714	0.97934	0.57000	7.27000
CD 117 P1	1.95143	7	1.37572	1.893	0.51997	0.19000	4.10000
CD73 CP	80.95571	7	10.24583	104.977	3.87256	64.29000	94.27000
CD73 P1	81.78643	7	10.54148	111.123	3.98431	66.86000	97.30000
CD 90 CP	56.93286	7	26.11297	681.887	9.86977	23.35000	99.28000
CD 90 P1	63.50857	7	28.88108	834.117	10.91602	12.92000	97.40000
CD14 CP	5.27714	7	4.51699	20.403	1.70726	2.09000	14.60000
CD14 P1	2.85857	7	2.33246	5.440	0.88159	0.53000	7.41000
CD 47 CP	51.12000	7	18.59732	345.860	7.02913	24.00000	71.05000
CD 47 P1	47.34571	7	13.52950	183.047	5.11367	33.54000	69.43000
All Grps	33.69065	84	34.14693	1166.013	3.72574	0.19000	99.28000