



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTADO DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.
DEPARTAMENTO DE CÓRNEA Y CIRUGÍA REFRACTIVA

**“ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE
FIBROBLASTOS LIMBOCORNEALES HUMANOS”**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO OFTALMÓLOGO

PRESENTA

DRA. NUBIA CITLALI ORTIZ DORANTES

TUTORES EXTERNOS:

DR. VICTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO
M. EN C. ATZIN ROBLES CONTRERAS

ASESORES:

DRA. REGINA VELASCO RAMOS
DR. ALEJANDRO BABAYAN SOSA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Córnea y Cirugía de Refractiva del Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P. y la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” .

" Conocimientos puede tenerlos cualquiera, pero el arte de pensar es el regalo más escaso de la naturaleza "

Federico II, Emperador de Prusia.

***A mis padres, Ángeles y Manuel,
por haber soñado un futuro para mi
incluso antes de que abriera los ojos.
Mi esencia lleva siempre parte de ustedes, los amo.***

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir y encontrar en mi camino lo que me ha hecho quien soy.

A mis hermanos Fer, Yeny y Mane, por su compañía y apoyo, los quiero mucho.

A mi Amor, por su apoyo, comprensión, y sobre todo por demostrarme durante tanto tiempo que hay cosas invaluable en la vida. Como bien dices, el ser humano es perfectible. Siempre me acompañarás de alguna manera. Este sueño, también ha sido tuyo.

A mis asesores por el tiempo invertido en éste trabajo.

Al Dr. Victor Bautista y a la M. en C. Atzin por su confianza, tenacidad, pero sobre todo por la oportunidad de trabajar con ustedes y brindarme sus consejos.

A Charlie López, por su tiempo invertido y ayuda desinteresada, mil gracias.

A el Dr. Leopoldo Santos Argumedo y al M. en C. Héctor Romero, por creer en mi antes de dar mi pequeños pasos en este fascinante mundo de la investigación, mil gracias, siempre los llevo conmigo.

A mis amigos Dave, Clau, Tay y Mari, por hacer de estos últimos años una mejor experiencia, su apoyo y su amistad es invaluable, los adoro. A mis amigos de siempre Moy y Robert, tantos años y espero sean muchos más.

A mi Abue Mari, porque sus plegarias me acompañan siempre.

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	10
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III.- JUSTIFICACIÓN	18
IV.- HIPÓTESIS	18
IV.- OBJETIVO	19
V.- METODOLOGÍA	20
VI.- RESULTADOS	22
VII.- DISCUSIÓN	31
VIII.- CONCLUSIÓN	33
IX.- ANEXOS	34
X.- BIBLIOGRAFIA.....	40

ABREVIATURAS

CK	Citoqueratina
D-MEM	Siglas en inglés: <i>Dulbecco modified Eagle's médium</i>
DS	Desviaciones estandar
FBS	Suero fetal bovino
FLC	Fibroblastos Limbo-corneales
KSFM	Medio de queratinocitos libre de suero
p53	Siglas en inglés: <i>transformation related protein 53 KDa</i>
p63	Siglas en inglés: <i>transformation related protein 63 KDa</i>
PMC	Células postmitóticas (de PMC: Post-mitotic Cells)
TAC	Células amplificadoras transitorias (de TAC: Transient Amplifying Cells)
TDC	Células terminales diferenciadas (de TDC: Terminally Differentiated Cells)

INTRODUCCION

Hay varios ejemplos en el reino animal de la habilidad de regenerar tejidos después del daño. Nuestra capacidad para reemplazar ciertos tejidos está dada por una pequeña población de células madre o “stem cells” que se auto regeneran. La superficie corneal es de las más especializadas del cuerpo en constante estado de renovación especialmente en el epitelio (5,16).

Se encuentran 3 tipos celulares principalmente en la córnea: células epiteliales, fibroblastos corneales y células endoteliales (2,16). El epitelio corneal es no queratinizado, escamoso y estratificado; que junto con el epitelio limbal y conjuntival, cubren la superficie ocular sirviendo como barrera protectora contra la pérdida de fluidos y la penetración de patógenos (4,16,17). Todos ellos de origen ectodérmico difieren en sus características y funciones. Diferencias reflejadas en sus patrones únicos de expresión genética (8).

Las diferencias entre los fenotipos epiteliales conjuntival y corneal se basa en la expresión de queratinas, mucinas y glucocalix. El limbo es la zona transicional entre los epitelios corneal y conjuntival. Morfológicamente es diferente de la córnea en que posee células de Langerhans y melanocitos y de la conjuntiva en que carece de células caliciformes; y se encuentra sobre un estroma altamente vascularizado (5,8). Se muestra en la figura 1 la ubicación de la zona limbal.

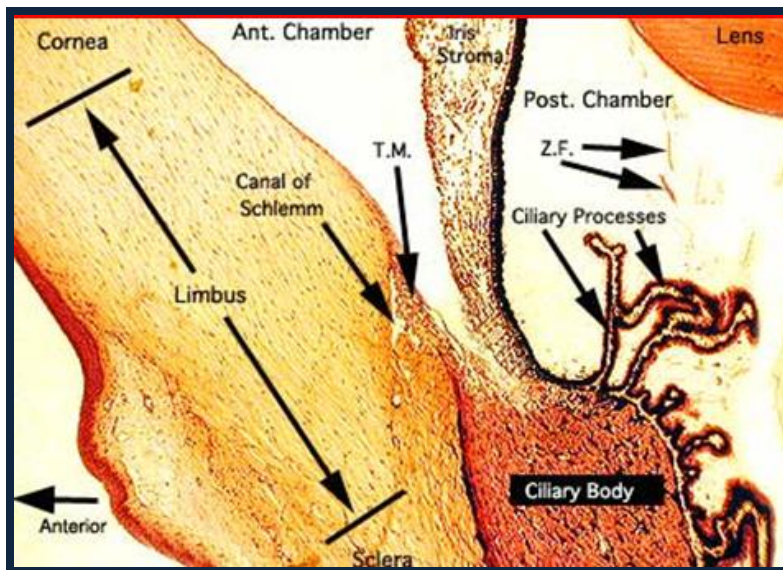


Figura 1. Limbo esclerocorneal (tomada de <http://www.nei.nih.gov/photo/evan/index.asp>).

CÉLULAS MADRE EN EL OJO

Las células madre poseen varias características únicas que explican su importante papel en el mantenimiento de los tejidos:

- Proliferación libre de errores
- Pobre diferenciación
- Duración de vida larga
- Ciclo celular largo
- Capacidad de división simétrica y asimétrica

La diferenciación terminal del epitelio de la superficie ocular, empieza con el paso de las células madre a células amplificadoras transitorias (TAC: Transient Amplifying

Cells). Estos dos tipos de células constituyen el compartimento proliferativo, poseen características diferentes y están separadas anatómicamente, lo cual hace del ojo un modelo ideal para estudiar la regulación de células pluripotenciales. Estos dos tipos de células basales dan origen a células suprabasales del compartimento diferenciativo: las células postmitóticas (PMC: Post-mitotic Cells) y las células terminales diferenciadas (TDC: Terminally Differentiated Cells) (16,19). En la figura 2 se muestra un diagrama hipotético del nicho dónde se encuentran las células madre limbales y el desarrollo propuesto.

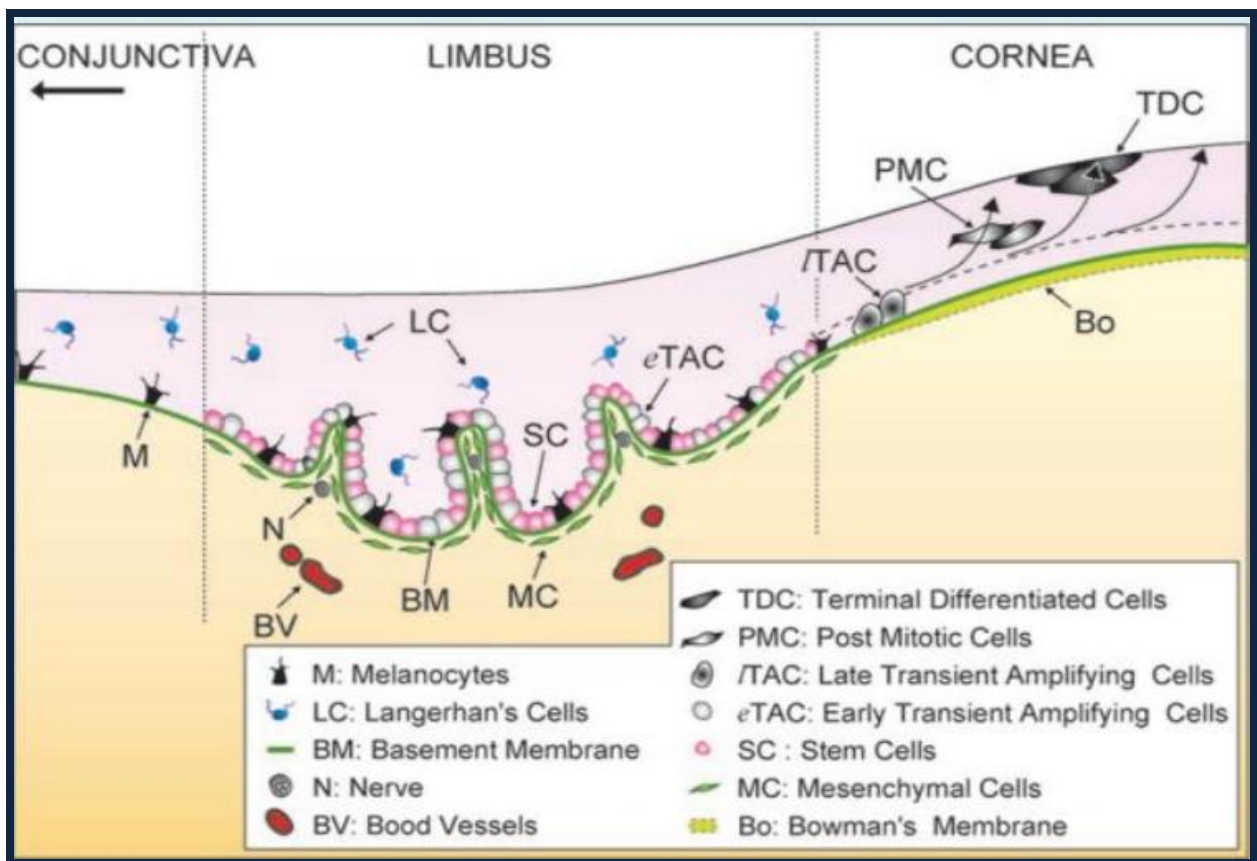


Figura 2. Diagrama hipotético del nicho de las células madre limbales y los diferentes niveles de localización celular (tomada de Marzieh Ebrahimi, PhD, 2009; 4(1): 40-58)

TIPOS Y FUNCIONES DE LAS CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES

Células Madre

Son pocas en número, pero tienen alta capacidad de auto-regeneración y amplio potencial proliferativo. En tejidos sanos tienen una tendencia a permanecer quiescentes. Éstas sufren una diferenciación a células amplificadoras transitorias (TACs) cuando son estimuladas y se localizan en la capa basal del epitelio limbal (6, 19,21).

Células Amplificadoras Transitorias (TACs)

Las TACs en el limbo y la córnea periférica muestran algunas características de células madre, tales como una vida larga, ciclo lento con baja actividad mitótica y menos diferenciación en el estado estacionario normal. En contraste, las TACs en la córnea tienen menor duración de vida, ciclos celulares rápidos, y puede amplificar la masa celular más efectivamente a través de rondas limitadas de mitosis.

En un punto crítico, las TACs detienen su mitosis y se diferencian en células suprabasales post-mitóticas y finalmente en células diferenciadas (TDCs) aunque el mecanismo exacto permanece desconocido (16,25).

Células Diferenciadas Terminales (TDCs) y Células Post-mitóticas (PMCs)

Éstas células no tienen capacidad de auto-renovación ni potencial proliferativo. En tejidos sanos están siendo desechadas continuamente y reemplazadas por su

tiempo de vida limitado. Están localizadas en la parte superficial de la córnea central y tienen muchas uniones fuertes del tipo “tight junctions” (17).

IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE LIMBALES

Durante los últimos años, se ha progresado en la identificación y desarrollo de marcadores moleculares que puedan distinguir entre células madre y células amplificadoras transitorias *in situ*. Y aunque cierto grupo de aparentes marcadores se han propuesto su rol para la identificación de células madre aún es controversial. Algunos de los marcadores conocidos para células humanas son los siguientes (Figura 2 tomada de Marzieh Ebrahimi, PhD et al. 2009; 4(1): 40-58)(16):

MARCADORES MOLECULARES PARA CÉLULAS MADRE LIMBALES

Proteínas de citoesqueleto

Las citoqueratinas (CK) o queratinas son un grupo de proteínas de citoesqueleto que forman filamentos intermedios en las células epiteliales y son expresadas en distintos patrones durante el desarrollo epitelial y diferenciación. La subfamilia comprende al menos 20 diferentes polipéptidos (20).

CK 12 y CK 3 son específicamente expresadas en células epiteliales corneales y son consideradas marcadores epiteliales de diferenciación. La aparición de ambas durante la migración del estroma limbal al corneal ha sido interpretado como diferenciación de células madre a amplificadoras transitorias (TACs). Pertenecen ambas proteínas a los filamentos intermedios(13,14,19).

CK 19 y Vimentina son dos marcadores pluripotenciales, ambos componentes de los filamentos intermedios (3,13,14), los cuales están involucrados en el mantenimiento de la arquitectura y adhesión celular. La citoqueratina 19 es considerada un marcador de proliferación de queratinocitos en la piel y ha sido usada para localizar células madre epidérmicas; aunque junto con vimentina, han sido localizados en las células basales limbales humanas. En un estudio reciente la expresión de citoqueratina 19 fue más pronunciada en el citoplasma de células basales epiteliales que en las suprabasales del limbo.

Proteínas nucleares

P63 es un factor de transcripción, pertenece a la familia de genes p53 (19). Es expresado en el núcleo de las células epiteliales con potencial proliferativo de piel, cérvix, próstata y córnea. Juega un papel importante en la morfogénesis, al verse involucrado en la regulación del desarrollo y diferenciación epitelial. En la Figura 3, tomada de Marzieh Ebrahimi, et al. J Ophthalmic Vis Res 2009; 4(1): 40-58.

Markers	Limbal Epithelia		Corneal Epithelia	
	Basal	Suprabasal	Basal	Suprabasal
Cytoplasmic/Nuclear				
Cytokeratin K5/K14	+++	+++	±	-
Keratin K3/K12	-	+	+++	+++
Cytokeratin K19	+++	-	-	-
Vimentin	+++	+	-	-
Enolase- α	+++	+	+	-
Metallothionein	+	+++	-	+++
P63	+++	+	+	-
Nestin	-	-	+++	+++
Cell Surfaces				
Connexin 43	-	+	+	+++
E-Cadherin	+	+++	+++	+++
P-Cadherin	±	-	+	-
β Catenin	+++	+++	+++	+++
Integrin α 2	±	+	+++	+
Integrin α 3	±	+	+++	+
Integrin α 6	±	+	+++	+
Integrin β 1	+++	+	+++	+
Integrin β 2	+	+	+	+
Integrin β 4	+++	+	±	+
Integrin β 5	+	-	+	+
EGFR	+++	+	+++	++
ABCG2	+++	-	-	-
Involucrin	-	+++	+	+++

-, undetectable; \pm , weak positivity; +, moderate positivity; +++, strong positivity. EGFR, epithelial growth factor receptor; ABCG, ATP binding cassette G.

Figura 3. Localización inmunohistoquímica semicuantitativa de marcadores de células madre corneales humanas y epitelio limbal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe de la existencia de las células madre y de las células amplificadoras transitorias, así como su papel en patologías donde su función se ve alterada como por ejemplo en la deficiencia de células madre limbales (Limbal Stem Cell Deficiency “LSCD”), pero se desconoce el funcionamiento de las mismas involucrado en las enfermedades, por lo que es importante desarrollar el cultivo para crear modelos de estudio *in vitro*.

JUSTIFICACION

Los fibroblastos limbocorneales poseen características descritas de células pluripotenciales, lo que las convierte en una línea celular adecuada de estudio para todas aquellas patologías que muestran alteración en la reparación tisular corneal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Establecer el cultivo y fenotipificación de fibroblastos limbocorneales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Aislar y cultivar los fibroblastos limbo-corneales humanas a partir de rodetes esclerocorneales humanos de donadores cadavéricos.
- Caracterizar fenotípicamente a estas células con marcadores específicos (p63, CK12, CK19 y vimentina).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio prospectivo y experimental.

METODOLOGÍA:

Se utilizaron rodetes esclerocorneales de donadores cadavéricos, los cuales fueron procesados para obtener los cultivos primarios de fibroblastos limbo-corneales.

Una vez obtenido el cultivo primario se procedió a caracterizar fenotípicamente, por medio de citometría de flujo, buscando los marcadores moleculares característicos.

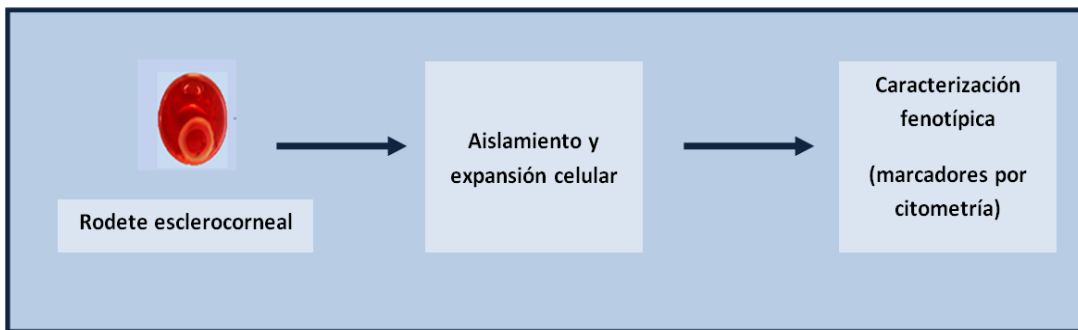


Figura 4. Protocolo general

Aislamiento de fibroblastos limbo-corneales humanos

Para realizar el cultivo primario se utilizaron rodetes esclerocorneales, los cuales en el historial de donación no deben presentar algún tipo de infección. A partir de estos rodetes, se retira lo más posible el área de esclerótica, para después realizar cortes más pequeños e incubar a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad (Ver protocolo I, Apéndice I)

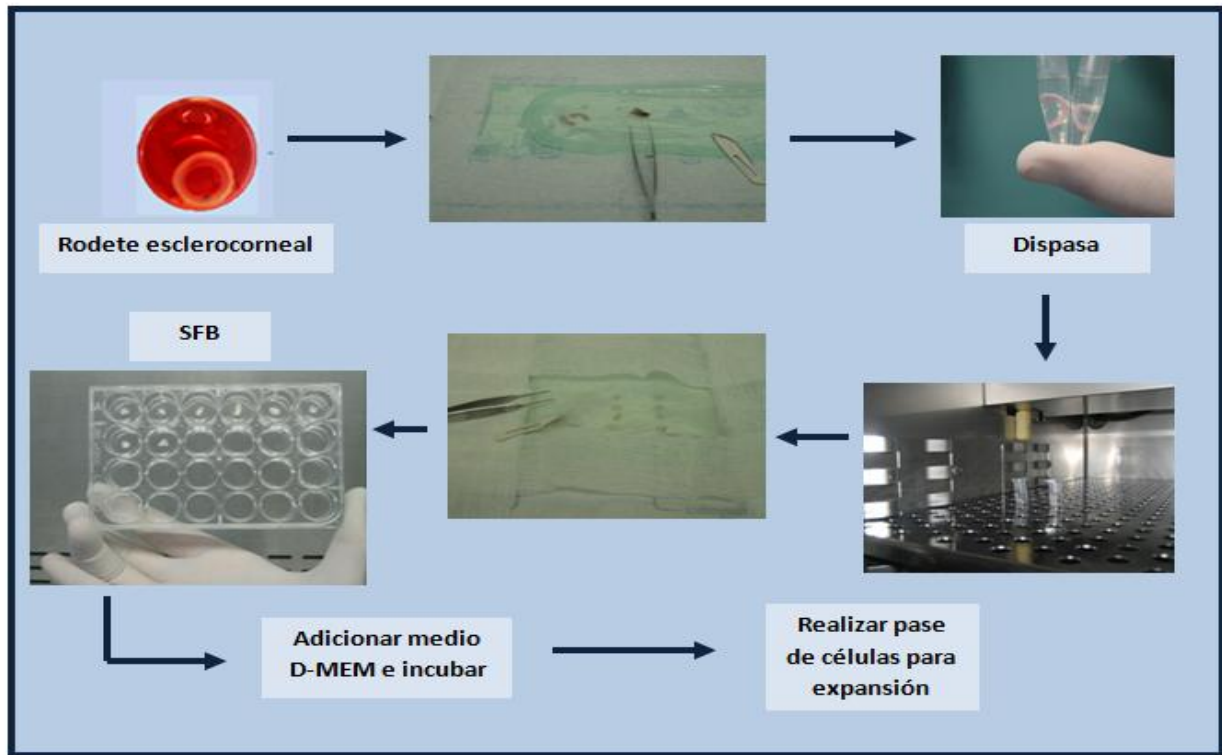


Figura 5. Proceso de aislamiento de fibroblastos limbo-corneales

Caracterización fenotípica

Como partimos de un cultivo primario, se requiere de una caracterización de las mismas. Esta fenotipificación abarca diferentes puntos (Ver protocolo 2, Apéndice I):

- Morfología
- Marcadores moleculares (analizados por citometría)

RESULTADOS

Aislamiento de fibroblastos limbo-corneales

EL objetivo de este trabajo, es el de caracterizar a los fibroblastos limbo corneales humanos fenotípicamente.

Esta caracterización se realizó observando el crecimiento, su morfología y el tiempo de crecimiento. De acuerdo al estudio realizado estas células tardan en crecer de 4 a 5 días (Figuras 6 a 13) alcanzando de un 90 a un 95% de confluencia.

La morfología encontrada en el cultivo corresponde a la descrita para fibroblastos limbocorneales.

El procedimiento se siguió de acuerdo a la metodología mencionada (Figura 5).



Figura 6 . Disección de la porción limbal del rodete esclerocorneal.

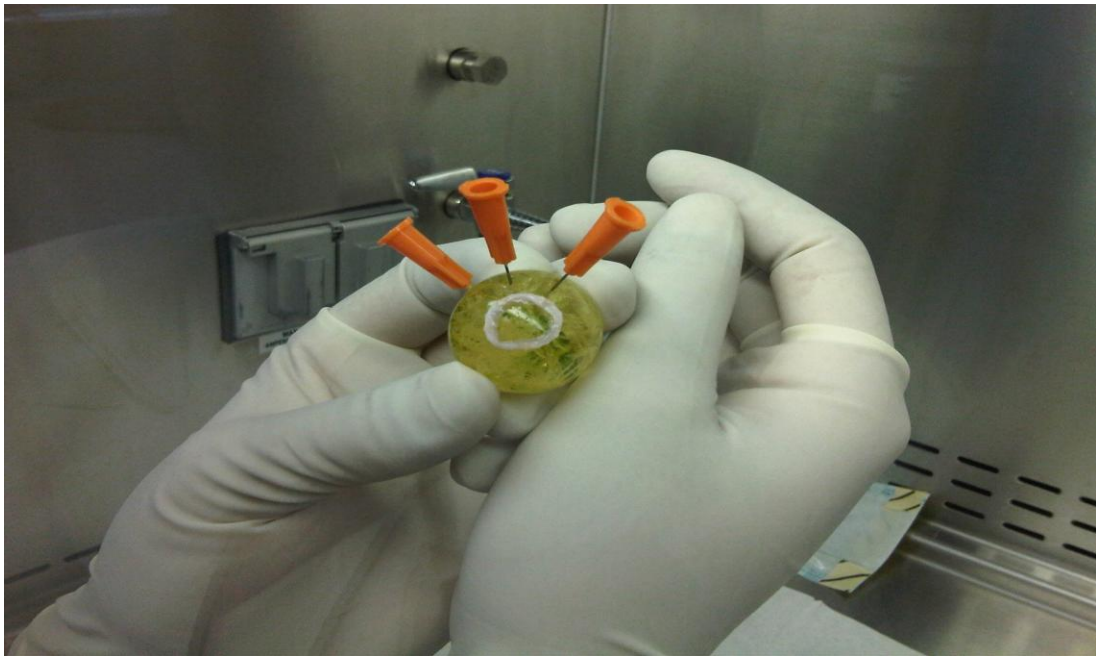


Figura 7 . Fijación del rodete.

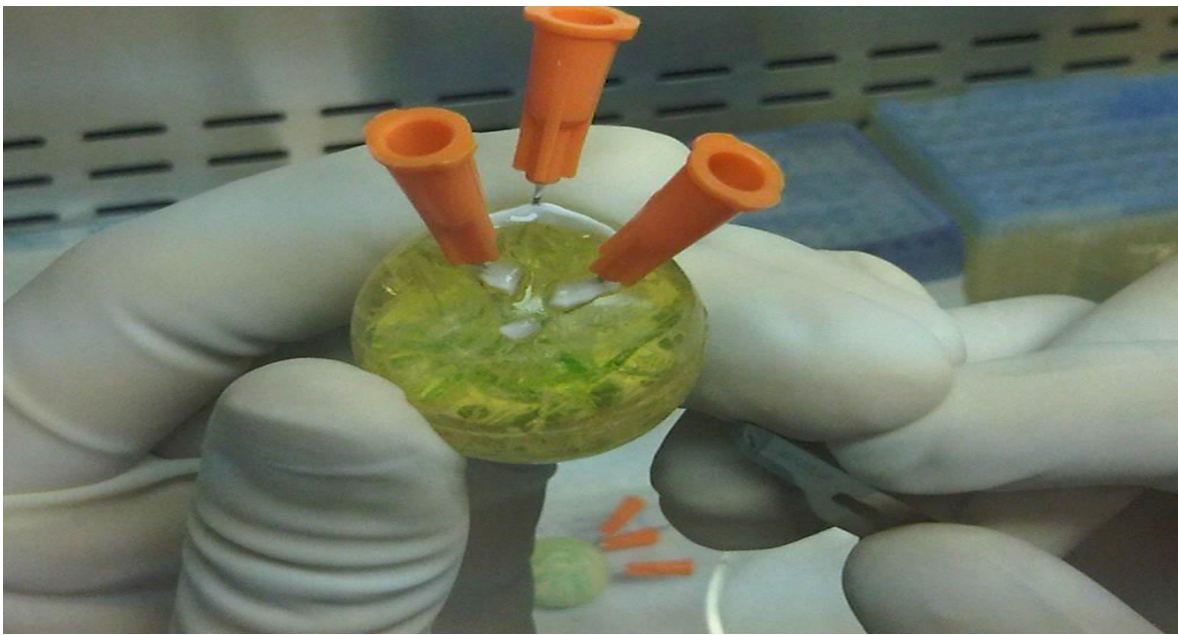


Figura 8. Corte del rodete.



Figura 9. Inicio de la disgregación del tejido con dispasa II.

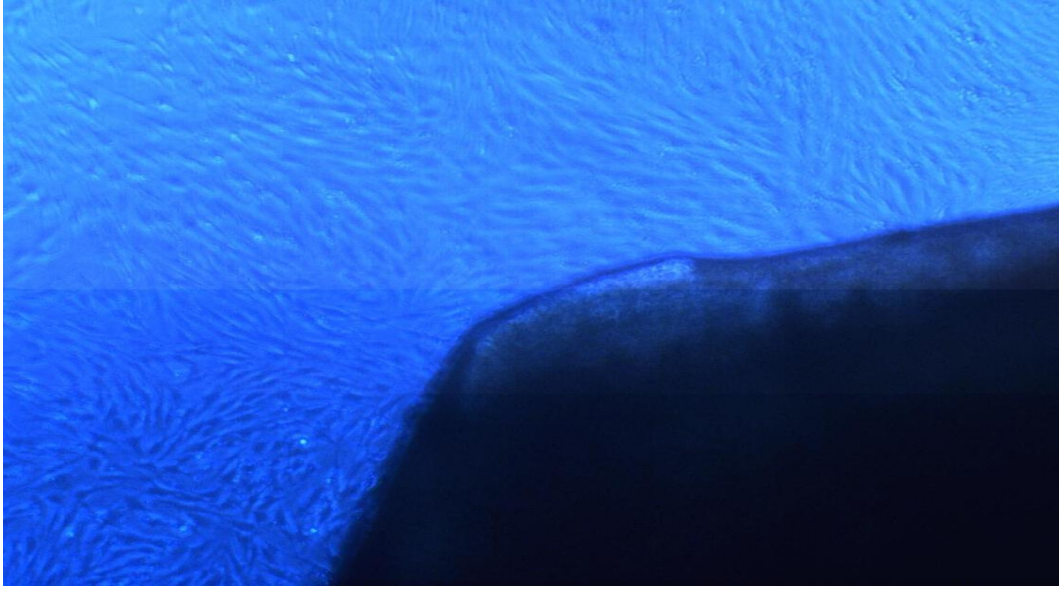


Figura 10. Explante con células en el 4° día.

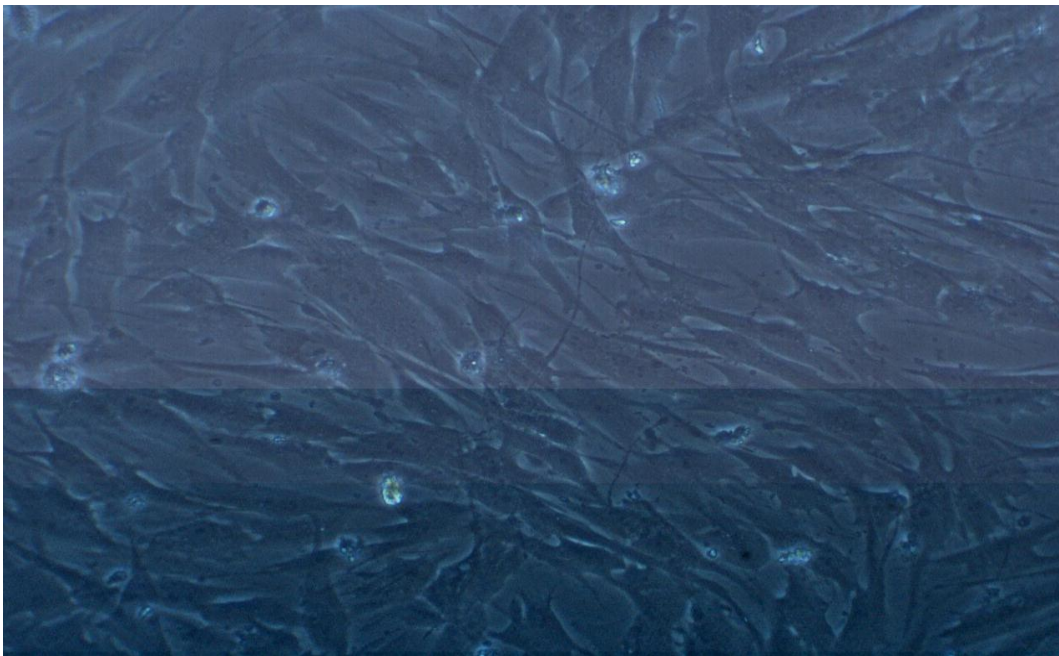


Figura 11 . Fibroblastos limbo-corneales al segundo pase.

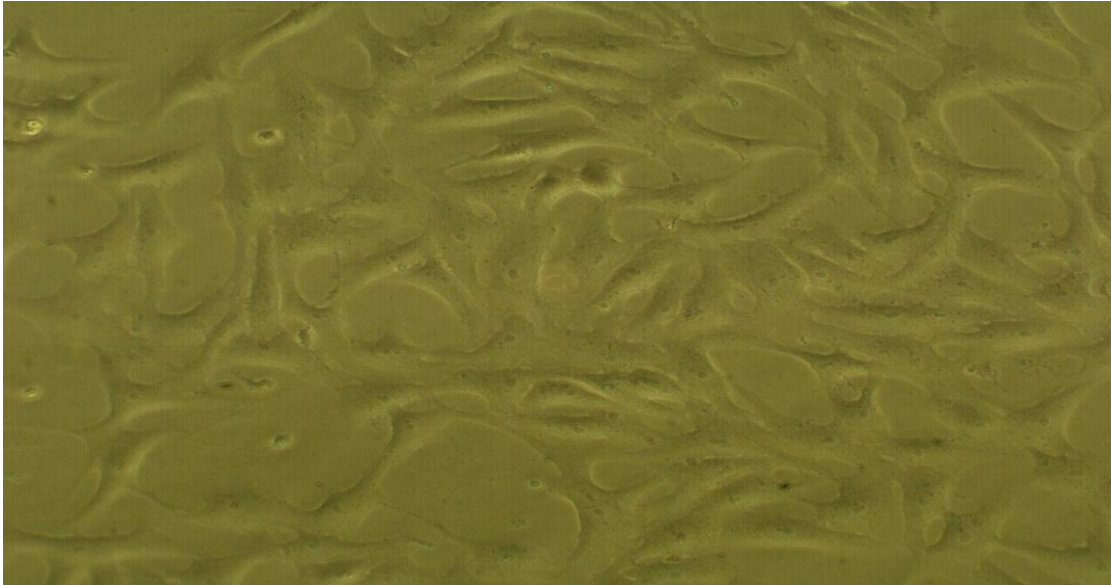


Figura 12. Fibroblastos limbo-corneales al décimo pase.

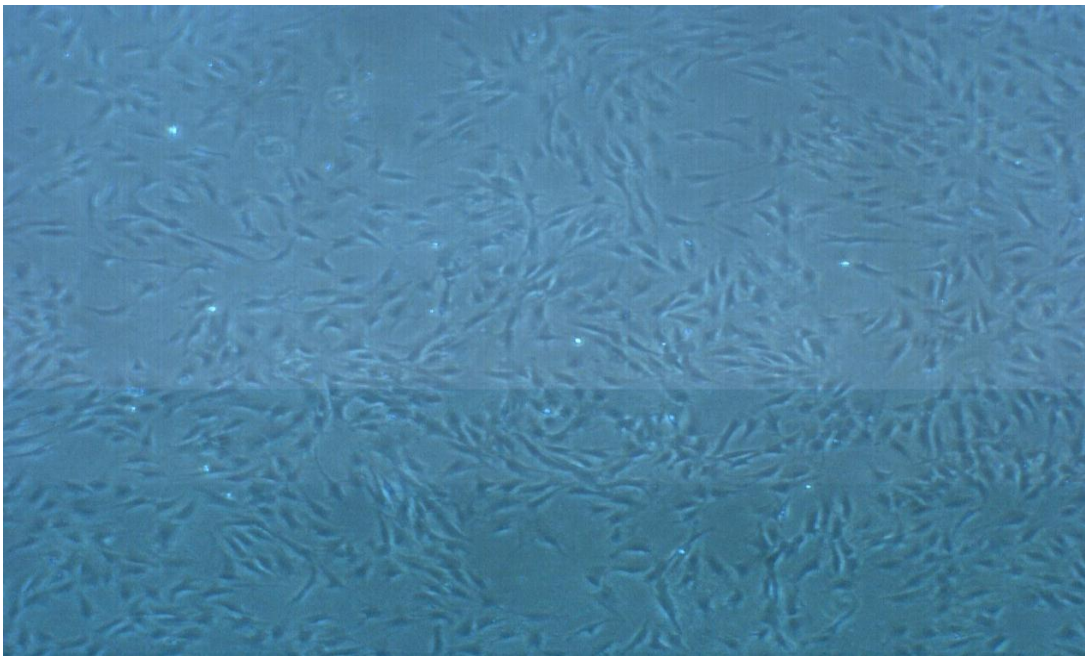


Figura 13. Fibroblastos limbo-corneales al decimocuarto pase.

Caracterización fenotípica

Se llevo a cabo una caracterización molecular, a través de marcadores celulares (Figura 2). La presencia o ausencia de estos marcadores determina si las células obtenidas en el cultivo son las esperadas.

Se analizaron dos marcadores pluripotenciales (CK19 y p63) y uno diferencial (CK12), además de vimentina.

Se realizaron tres experimentos para la caracterización fenotípica, por citometría de flujo, en los cuales se analizaron Vimentina, CK 12, CK19 y p63 (fig. 17). Se obtuvieron valores del porcentaje de células que presentaron los marcadores, estos datos están resumidos en la tabla 1. El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa Graph Pad Prism 5.0.

Tabla 1. Porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores de fenotipificación

MARCADORES	% CÉLULAS POSITIVAS
p63	4.78 ± 0.56 DS
Citoqueratina 12	53.09 ± 0.56 DS
Citoqueratina 19	0.79 ± 0.56 DS
Vimentina	2.21 ± 0.56 DS

Figuras representativas de los experimentos de citometría de flujo.

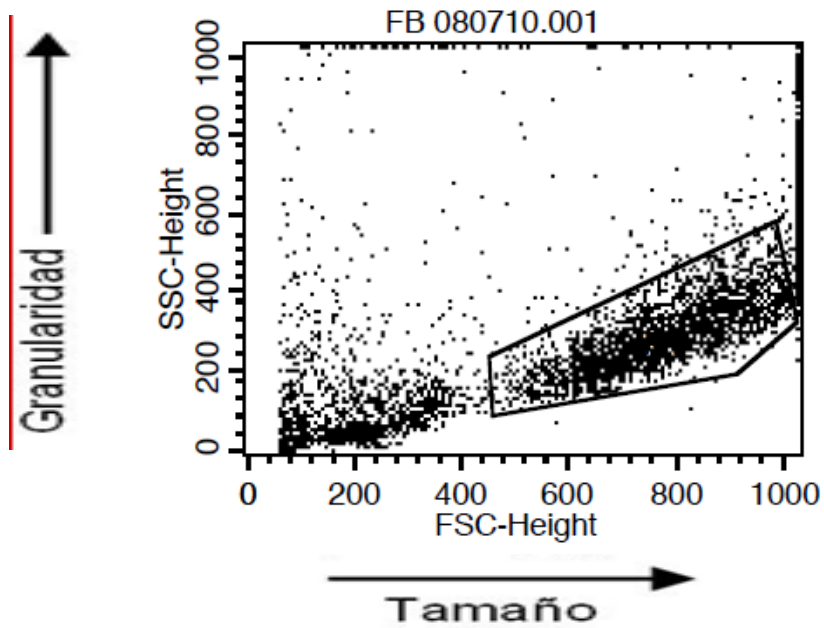


Figura 14. Región seleccionada para estudio por tamaño y granularidad.

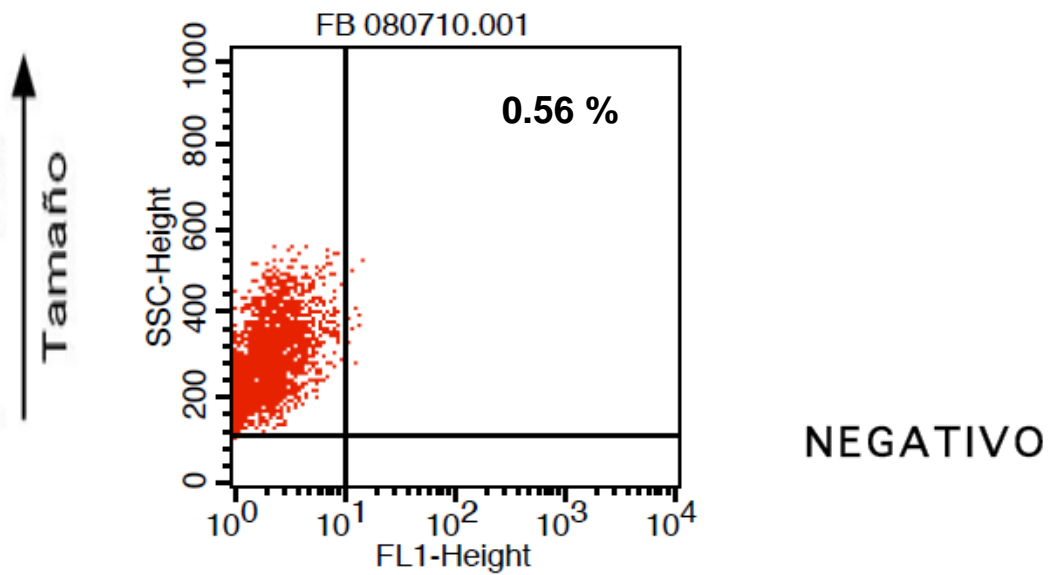


Figura 15. Control negativo de tinción.

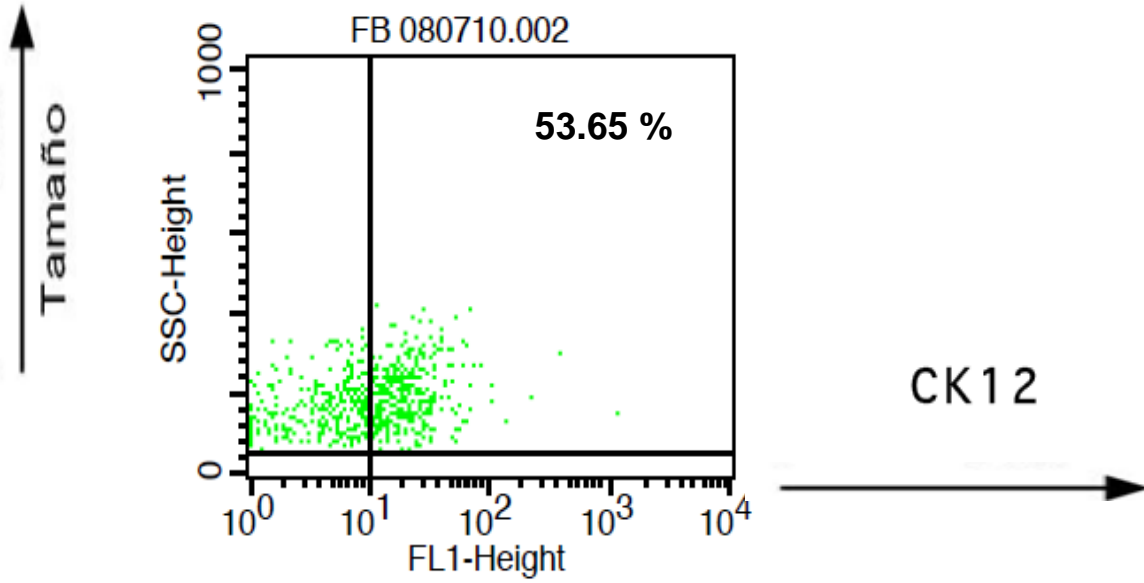


Figura 16. Esquema representativo de la tinción para citoqueratina 12.

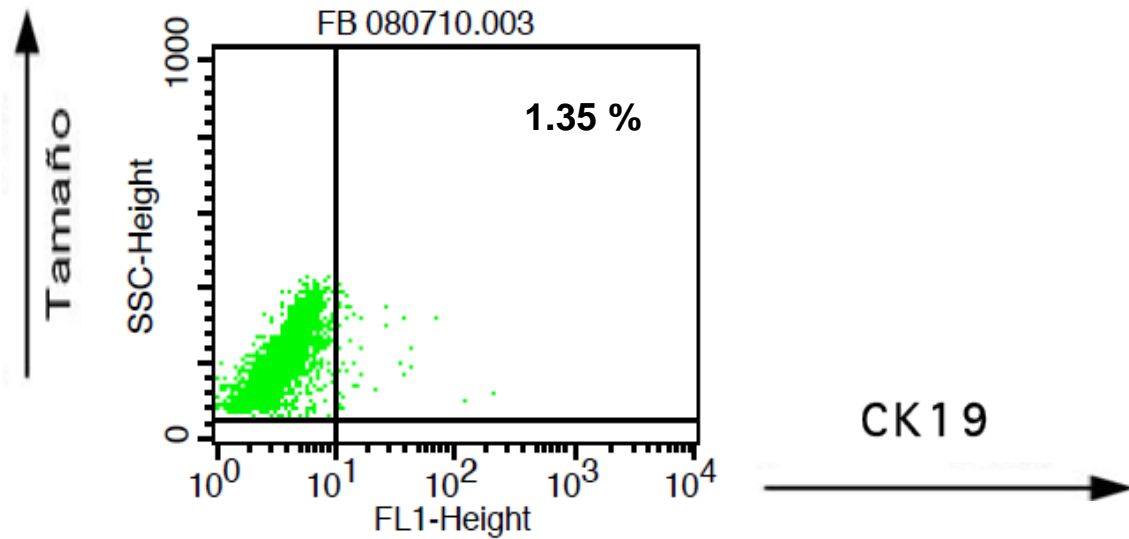


Figura 17. Esquema representativo de la tinción para citoqueratina 19.

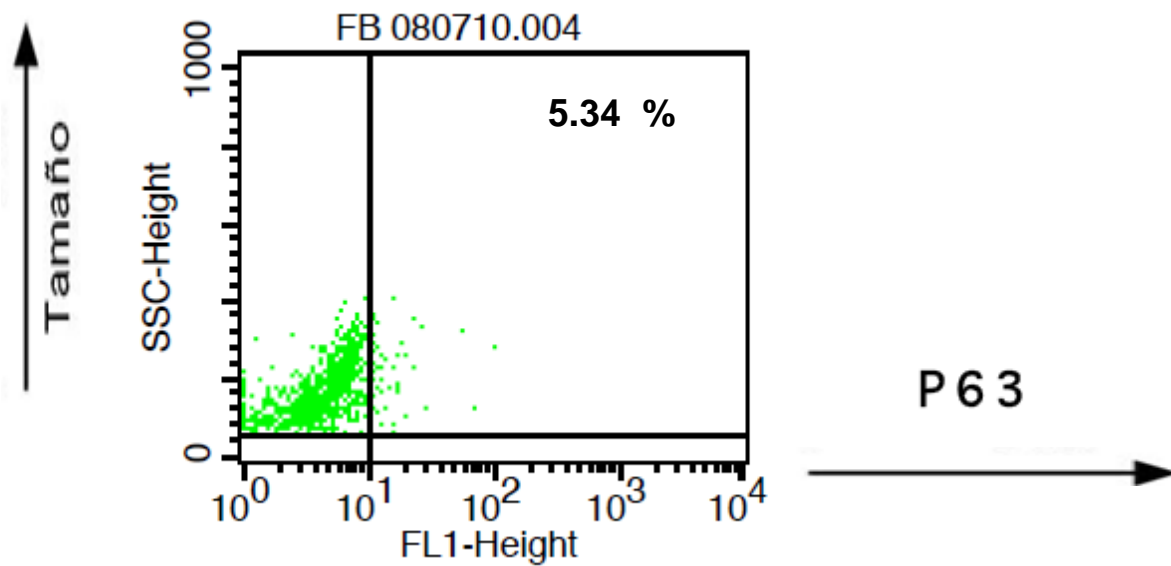


Figura 18. Esquema representativo de la tinción para p63.

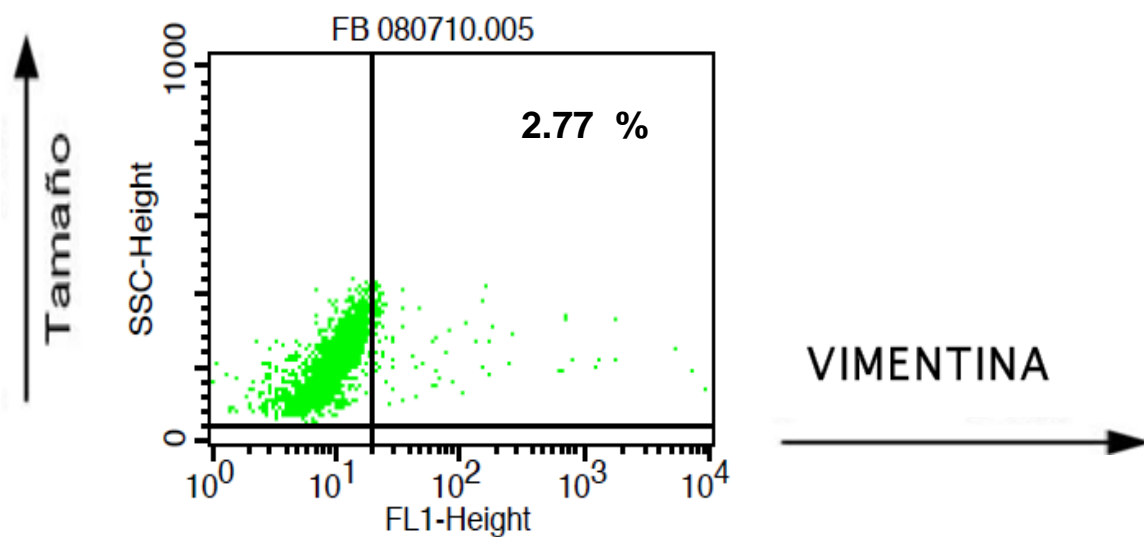


Figura 19. Esquema representativo de la tinción para vimentina.

DISCUSIÓN:

Se observó una buena tasa de crecimiento de éstas células en cultivo, así como el hecho de que se mantiene su morfología a través de los pases realizados. Esta es, compatible con lo descrito para fibroblastos.

Es importante mencionar, que a diferencia de otras líneas celulares cultivadas a partir del mismo tipo de rodete esclerocorneal, como por ejemplo, las células limbo-epiteliales humanas o “HuLEC” (por sus siglas en inglés Human Limbal Epithelial Cells); la morfología y diferenciación de nuestro cultivo no se ve alterada por la presencia de factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo como en dichas células, tales como el factor de crecimiento epidermal, extracto bovino pituitario, insulina, transferrina, selenito y demás componentes del medio KSFM en las que las células HuLEC se ha descrito su cultivo.

Los factores de crecimiento que no están presentes en nuestro medio de cultivo pueden tener cierto papel en la expresión de marcadores, así como en el mantenimiento de la morfología de nuestras células en cultivo.

Con respecto a la caracterización la lectura de cada uno de los marcadores fue ajustado previamente a la fluorescencia propia de las células sin teñir.

CK19 son proteínas de citoesqueleto que forman parte los filamentos intermedios, esta junto con la vimentina (otra proteína de citoesqueleto) son características de las células basales del epitelio limbal humano.

p63 es una proteína involucrada con la supresión de tumores y la morfogénesis celular, esta proteína solo se encuentra localizada en las células limbo-epiteliales pero no en aquellas totalmente diferenciadas.

Por último tenemos a la CK12 como marcador diferencial esta proteína de citoesqueleto pertenece al mismo grupo que CK19 pero a diferencia de esta última CK12 se presenta en las células suprabasales del limbo epitelial y en las corneales centrales (totalmente diferenciadas).

De acuerdo a la fenotipificación de las células obtenidas en cultivo, se cumple lo esperado en cuanto a que los fibroblastos limbocorneales se han descrito citoqueratina 19 negativos, vimentina y p63 escasamente positivos. Aunque se encontró expresión en parte de la población de citoqueratina 12 en un porcentaje mayor al reportado en los marcadores descritos anteriormente, que como se mencionó, se encuentra sobre todo en células diferenciadas epiteliales.

Todo lo anterior, tomando en cuenta que se ha mencionado en diferentes trabajos que los fibroblastos limbo-corneales poseen características de células TAC, podría significar que la variación en cuanto a la cantidad de citoqueratina 12 encontrada en nuestra células pueda referirnos que éstas se encuentran justamente en un estado medio de diferenciación entre las células limbales epiteliales suprabasales y las células corneales basales, ya que éstas últimas expresan CK 12 en mayor cantidad.

Al revisar la metodología de la tinción de los marcadores celulares, consideramos que sería conveniente ajustar los resultados a la intensidad media de fluorescencia en cada caso para que los mismos sean más detallados.

CONCLUSIÓN:

- Se requiere de aproximadamente 4-5 días para obtener un pozo de 1cm de diámetro con una confluencia del 95%.
- La morfología en el cultivo corresponde a la descrita para fibroblastos limbo-corneales.
- Las células obtenidas a partir de rodetes esclerocorneales cadavéricos, corresponden, según los resultados reportados por citometría de flujo a fibroblastos limbo-corneales humanos.
- Pueden plantearse nuevos experimentos para determinar más a fondo las características respecto a su función, desarrollo o alteración de su estructura en enfermedades de interés.

ANEXO 1. MÉTODOS

Material.

Placas de cultivo celular (Costar, Corning, NY, USA), medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA), tripsina/EDTA (Sigma, St. Louis Missouri, USA), Dispasa II (Roche, Mannheim, Germany), penicilina/estreptomicina (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA), microscopio invertido (Olympus, Japan), incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA)

Protocolo I. Obtención de fibroblastos limbocorneales humanos.

El tejido limbo-corneal conservado en OptisolTM-GS (Bausch and Lomb Inc, Rochester, NY, USA) a 4 °C, procedente de donadores cadavéricos, fue obtenido del Banco de Ojos del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana-Cruz roja, México, D.F.

El tejido limbo-corneal fue fijado a pelotas de goma con agujas de insulina para su disección, se eliminó con bisturí (N° 11) el exceso de esclera, cornea y la inserción del iris. El borde limbal fue tratado con dispasa II (1.2 UI) durante 45 min/37°C, 5% CO₂ y 95 % de humedad; después se lavó con PBS y se cortaron fragmentos de aprox. 4 mm² para ser colocados en placas de 24 pozos. Se colocaron 25 microlitros de suero fetal bovino durante 24 h, transcurrido este tiempo se adicionó 700 microlitros de medio D-MEM (Dulbecco) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de

penicilina, 100 µg /mL de estreptomicina. El tejido así tratado fue incubado en las condiciones antes mencionadas. El medio fue cambiado cada dos o tres días según crecimiento. Los pases celulares se realizaron con tripsina-EDTA 0.025%, incubando de 5-10 min, vigilando la disgregación celular observando al microscopio invertido, deteniendo el efecto de la enzima con medio DMEM 5% suero fetal bovino.

Protocolo 2. Caracterización de células limbocorneales por marcadores intracelulares.

- Las células serán contadas y distribuidas en 7 tubos a razón de 1×10^6 células.
- Las células obtenidas por tripsinización son lavadas 2 veces con 1mL de PBS y centrifugadas a 1500 rpm/5min.
- Eliminar el sobrenadante e incubar las células en 250 µL de Cytifix/Cytoperm por 20 min a 4°C.
- Lavar una vez con el buffer (1mL) BD Perm/wash diluido 1:10 con agua bidestilada, centrifugar 1500 rpm/5 min.
- Eliminar el sobrenadante y realizar la tinción intracelular según protocolo.
- Lavar con buffer 1X, centrifugar a 1500rpm/5min.
- Eliminar sobrenadante y fijar las células con 20 µL de paraformaldehído 4% por 20 minutos
- Lavar 2 veces con 1 mL. de PBS centrifugando y eliminando el sobrenadante entre cada lavada.
- Analizar por citometría de flujo.

Protocolo 2.1. Tinción para CK19 ó p63.

- Los anticuerpos son primarios generados en ratón y se utiliza una segunda tinción con un anticuerpo anti-ratón marcado con ficoheritrina (PE).
- Después de la permeabilización se lavan las células y se incuba con 10 µL de anti-CK19 ó anti-p63 diluido 1:10 con PBA 1% (PBS + albumina sérica bovina al 1%).
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 20 µL del 2o anticuerpo (Goat Antimouse Binding) diluido 1:1500 con PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Eliminar el sobrenadante y lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 10 µL de estreptoavidina-PE (SA-PE) diluido 1:300 con PBA 1% .
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Eliminar el sobrenadante y lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehido 4%.

Protocolo 2.2. Control de isotipo para CK19 y p63

- Otra fracción de células permeabilizadas se lavan e incuban con 10 μ L de PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 20 μ L del 2^o anticuerpo (**Goat Antimouse Binding**) diluido 1:1500 con PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Eliminar el sobrenadante y lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 10 μ L de estreptoavidina-PE (**SA-PE**) diluido 1:300 con PBA 1% .
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Eliminar el sobrenadante y lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehído 4%.

Protocolo 2.3. Tinción para vimentina

- Será utilizado un anticuerpo policlonal IgG hecho en cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), por lo que la tinción es directa:
- Después de la permeabilización lavar e incuban con 10 μ L de anti-vimentina diluido 1:10 con PBA.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.

- lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehído 4%

Protocolo 2.4. Control de isotipo para vimentina

- El anticuerpo anti-vimentina está marcado con el fluorocromo FITC por lo tanto es una tinción directa y como control de isotipo se utilizan solo células permeabilizadas:
- Después de la permeabilización lavar e incubar con 10 μ L PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehído 4%.

Protocolo 2.5. Tinción para CK12

El anticuerpo primario (anti CK12) está generado en cabra, por lo tanto el anticuerpo secundario es un anti-cabra generado en burro el cual está marcado con el fluorocromo proteína clorofila peridina (PerCP).

- Después de la permeabilización lavar e incubar con 10 μ L de anti-CK12 diluido 1:10 con PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 10 μ L de PerCP Donkey Anti-goat IgG.

- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehido 4%.

Protocolo 2.6. Control de isotipo para CK12

- Después de la permeabilización lavar e incubar con 10 μ L de anti-CK12 diluido 1:10 con PBA 1%.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 10 μ L de **PerCP Donkey Anti-goat IgG**.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavar con 1mL de buffer BD Perm/wash 1X y centrifugar 1500 rpm/7 min.
- Eliminar el sobrenadante y fijar las células con paraformaldehido 4%.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Ahmad S, Figueredo F, Lako M. **Corneal epithelial stem cells: characterization, culture and transplantation.** Regen Med 2006; 1:29-44.

- 2.- Beltrán, Orietta; Quintero, Lida Osmarla; Chaparro, Orlando. **Plasticity and transdifferentiation in adults stem cells – Review.** Med 2005; 13 (1): 10-16.

- 3.- Chen, Z., de Paiva, C.S., Luo, L., Kretzer, F.L., Pflugfelder, S.C., Li, D.-Q., 2004. **Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia.** Stem Cells 22, 355–366.

- 4.- Chung EH, Bukusoglu G, Zieske JD, **Localization of corneal epithelial stem cells in the developing rat.** Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33: 2199-2206.

- 5.- Daniels, Julie T., et al. **Corneal Stem cells in review.** Wound Repair Regen 2001; 9: 483-494.

- 6.- Dua, H.S., Azuara-Blanco, A., 2000. **Limbal stem cells of the corneal epithelium.** Surv. Ophthalmol. 44, 415–425.

- 7.- Edgard M. Espana, Tetsuya Kawakita, Chia-Yang Liu, Scheffer C. G. Tseng. **CD-34 expression by cultured human keratocytes is downregulated during myofibroblast differentiation induced by TGF- β 1**. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2004, 45 (9): 2985-2991.
- 8.- Fernández, A.; Moreno, J.; Prósper, F.; M. García, J. Echeveste. **Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques**. An. Sist. Sanit. Navar. 2008; 31 (1): 53–59.
- 9.- Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guerin SL. **Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?** Prog Retin Eye Res 2000; 19: 497-527.
- 10.- Girolamo, Nick Di. **Stem cells of the human cornea**. British Medical Bulletin 2011; 100: 191-207.
- 11.- Grueterich, M., Espana, E.M., Tseng, S.C.G., 2003. **Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche**. Surv. Ophthalmol. 48, 631–646.
- 12.- J. Mario Wolosin; Murat T. Budak; M. A. Murat Akinci. **Ocular surface epithelial and stem cell development**. Int. J. Dev. Biol. 48: 981-991 (2004).

- 13.- Kasper, M., 1992. **Patterns of cytokeratins and vimentin in guinea pig and mouse eye tissue: evidence for regional variations in intermediate filament expression in limbal epithelium.** Acta Histochem. 93, 319–332.
- 14.- Kasper, M., Moll, R., Stosiek, P., Karsten, U., 1988. **Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye.** Histochemistry 89, 369–377.
- 15.- Liu, C.Y., Zhu, G., Westerhausen-Larson, A., Converse, R., Kao, C.W., Sun, T.T., Kao, W.W., 1993. **Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development.** Curr. Eye Res. 12, 963–974.
- 16.- Marzieh Ebrahimi, PhD; Ehsan Taghi-Abadi, MSc; Hossein Baharvand, PhD. **Limbal stem cells in review.** J Ophthalmic Vis Res 2009; 4(1): 40-58.
- 17.- Moore JE, McMullen CB, Mahon G, Adamis AP. **The corneal epithelial stem cell.** DNA Cell Biol 2002; 21: 443-451.
- 18.- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., de Luca, M., 2001. **p63 identifies keratinocyte stem cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3156–3161.

- 19.- Schlötzer-Schrehardt, Ursula; Kruse, Friedrich E. **Identification and characterization of limbal stem cells review.** Experimental Eye Research 81 (2005) 247-264.
- 20.- Sun, T.-T., Eichner, R., Nelson, W.G., Tseng, S.C., Weiss, R.A., Jarvinen, M., Woodcock-Mitchell, J., 1983. **Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation.** J. Invest. Dermatol. 81, 109s–115s.
- 21.- Sun, T.-T., Lavker, R.M., 2004. **Corneal epithelial stem cells: past, presence, and future.** J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 2004;, 1–6.
- 22.- Ting-Shuai Jiang, Li Cai, Wei-Ying Ji, Yan-Nian Hui, Yu-Sheng Wang, Dan Hu, Jie Zhu. **Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats.** Molecular Vision 2010; 16: 1304-1316.
- 23.- Tseng, S.C.G., 1989. **Concept and application of limbal stem cells.** Eye 3, 141–157.
- 24.- Tseng, S.C.G., 1996. **Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells.** Mol. Biol. Rep. 23, 47–58.

25.- Wei L, Hayashida Y, Chen YT, Tseng S. **Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus.** Cells Res 2007; 17:26-36.

26.- Wilson, Steve E. MD; Netto, Marcelo, MD; Ambrósio, Jr, Renato, MD. **Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease.** Am J Ophthalmol 2003; 136:530-536.