



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

**FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ
I.A.P.**

**Estandarización del cultivo, caracterización
fenotípica y expresión de TLR's del epitelio
pigmentario iridiano humano, in vitro.**

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO OFTALMÓLOGO
PRESENTA:

DRA. KARINA DE LA LUZ MIRANDA SÁNCHEZ

ASESOR:
M. EN C. ATZÍN ROBLES CONTRERAS



CD. MÉXICO, D.F.

MAYO 2014



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 Centro de Investigación Biomédica del Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P., bajo la dirección de M. en C. Atzín Robles Contreras. Financiado por la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

I. Índice

I. Índice.....	3
II. Abreviaturas	5
III. Resumen.....	6
IV. Introducción	7
IV.1. Privilegio inmunológico ocular	7
IV.2. Participación de epitelios pigmentarios intraoculares en el privilegio inmunológico ocular	8
IV.3. Participación de la Respuesta inmune innata y adaptativa.....	9
V. Planteamiento del problema	12
VI. Justificación	12
VII. Hipótesis	13
VIII. Objetivo General.....	13
IX. Objetivos específicos:.....	13
X. Material y Métodos:	14
Material y reactivos.....	14
Tejido iridiano humano	14
Cultivo primario de hEPI.....	14
Obtención de las células cultivadas.	15
Citometría de flujo	15
XI. Resultados:.....	16
Estandarización del cultivo.....	16
Caracterización fenotípica	18
Expresión de TLR's	19
XII. Discusión	20
XIII. Conclusión.....	21
XIV. Referencias	22

Índice de Figuras

Figura 1 Estandarización del cultivo in vitro de las hIPE	16
Figura 2 Monocapa de células adherentes y confluentes epiteliales de hEPI. 17	
Figura 3 Migración celular a partir de esferas pigmentadas.....	18
Figura 4 Expresión de vimentina y CK12 en las hEPI.	18
Figura 5 Expresión de TLR`s. Citometría de flujo de las células postcultivo....	19

II. Abreviaturas

EPI	Epitelio pigmentario Iridiano
hEPI	Epitelio pigmentario iridiano humano
RI	Respuesta inmune
TLR	Receptores tipo toll
PBS	Phosphate buffered saline
DNAsa	Desoxirribonucleasa
HR	Humedad relativa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
CK	Citoqueratina
TLR	Receptor tipo Toll
ACAID	Siglas en inglés: Desviación inmunológica asociado a la cámara anterior
TGF	Siglas en inglés: factor transformador de crecimiento

III. Resumen

Resumen: El ojo está dotado de un “privilegio inmunológico” que se crea y mantiene por la interacción de factores anatómicos y moleculares. Investigaciones en murinos revelaron que el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar, iris y retina favorecen condiciones inmunomoduladoras para el mantenimiento de éste₍₈₎, mediante la expresión de moléculas de superficie y la secreción de factores solubles, mecanismos correspondientes a la respuesta inmune adaptativa; se describe inhibición de activación de linfocitos T por el epitelio pigmentario iridiano (EPI). El sistema inmune innato utiliza receptores para reconocer y responder a agentes patógenos, estas moléculas han sido estudiadas principalmente en la córnea y parcialmente en iris, sobre todo en murinos, desconociendo su participación exacta en el privilegio inmunológico. Existen pocos reportes de cultivos de iris humano, por ello es necesario estandarizar la metodología reportada y ajustarla a condiciones de laboratorio, para obtener células humanas de EPI *in vitro* y caracterizarlas inmunológicamente completando los estudios sobre su participación en el mantenimiento del privilegio inmunológico intraocular.

Metodología: Cultivo de células de hEPI *in vitro*, a partir de tejido de iridectomías de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, para su caracterización fenotípica y análisis de expresión de TLR's por citometría de flujo.

Resultados: Las condiciones y elementos estandarizados para la realización del cultivo fueron: digestión enzimática con PBS + Dispasa 1mg/ml + DNAsa 10.05mg/ml, a 37°C/95%HR/5%CO₂, disgregación mecánica del tejido, colocándolo posteriormente en placas de cultivo con medio RPMI-1640 suplementado. Obtuvimos migración celular a los 8±3 días y adherencia y confluencia a los 28±7 días, siendo positivas para CK-12, vimentina y TLR's 2,4 y 9.

Conclusiones: Conocer la participación de la respuesta inmune innata en el privilegio inmunológico ocular, nos llevará a comprender mejor los mecanismos generadores de inflamación y con ello en un futuro, poder incluso evitar las tan temidas secuelas que ella causa.

Palabras clave: Iris, TLR'S, cultivo *in vitro*, citoqueratinas, inmunoprivilegio.

IV. Introducción

IV.1. Privilegio inmunológico ocular

El ojo existe por una razón: otorgarnos el sentido de la visión y está diseñado para mantener y proteger su función; como parte de esta defensa, presenta características inmunológicas diferentes al resto del organismo, es un sitio dotado de un “privilegio inmunológico” el cual se crea y se mantiene por la interacción de múltiples factores^(1,4); el factor anatómico es importante y se logra mediante las barreras hemáticas, córnea avascular, uniones estrechas entre las células y la ausencia de ganglios propios para el drenaje linfático, creando así barreras para el paso de los antígenos a los compartimentos intraoculares⁽¹⁾.

En el caso de factores inmunológicos hablando a nivel molecular, se conoce por ejemplo que en el humor acuoso se encuentran una gran variedad de factores inmunosupresores que disminuyen la reacción inflamatoria contra los organismos patógenos, como medida de protección para mantener la agudeza visual sin cambios secundarios a inflamación^(1,2,4); algunos de estos factores inmunológicos ya han sido descubiertos como el factor transformador de crecimiento (TGF, por sus siglas en inglés)⁽⁵⁾, hormona estimulante alfa-melanocito, péptido relacionado al gen de la calcitonina ^(6,7), péptido intestinal vasoactivo y trombospondina⁽⁷⁾, contando cada uno con un diferente mecanismo de acción afectando tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa; además de estas moléculas antiinflamatorias, se ha descrito un proceso de desviación inmunológica asociado a la cámara anterior (ACAID por sus siglas en inglés) que induce una respuesta inmunológica “sistémica” que incluye la generación de linfocitos T supresores ^(1,2,4,5).

IV.2. Participación de epitelios pigmentarios intraoculares en el privilegio inmunológico ocular

Gracias a investigaciones en modelos murinos, se le otorgó al epitelio pigmentario, del cuerpo ciliar, iridiano y de la retina, un papel importante para el mantenimiento del “privilegio inmunológico” ocular⁽⁸⁾, por favorecer condiciones inmunomoduladoras mediante la expresión de moléculas de superficie tales como: ligando CD95 y CD86; así como mediante la secreción de factores solubles como: TGF, trombospondina y prostaglandina E2, descubriendo que en especial las células del epitelio pigmentario iridiano (EPI) inhiben la activación de linfocitos T (Ln T) por un mecanismo contacto dependiente entre el ligando CD86 y el Antígeno-4 asociado al Ln T Citotóxico, reduciendo así la inflamación intraocular⁽¹⁾. Aunque existen pocos estudios al respecto en el epitelio pigmentario iridiano humano (hEPI), se ha corroborado que también estas células al estar en contacto con Ln T *in vitro*, suprimen la activación de los mismos, incluso se ha reportado la expresión de moléculas coestimuladoras como PD-L1 y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I, aumentando su expresión al estimular las células de hEPI con IFN- γ , expresando también MHC II y PD-L2 cuando se estimulan de esta manera.

Los investigadores sugieren que la actividad inmunosupresora del hEPI humano está relacionado con PD-L1 y PD-L2, ya que estas células por lo menos en estudios *in vitro*, no demostraron expresión de CD80 ni CD86 como en los estudios con células de ratón. Sin embargo se sugiere la existencia de otras moléculas de supresión en las células de hEPI correlacionadas con la supresión de la activación de los LT⁽¹⁾.

IV.3. Participación de la Respuesta inmune innata y adaptativa.

Recordando que dentro del sistema inmune existe la respuesta adaptativa y la innata, es importante hacer mención que lo ya estudiado en relación a la expresión de moléculas y el mecanismo de acción para la activación o la supresión de los linfocitos en el ojo, corresponde a la respuesta inmune adaptativa, sin embargo el sistema inmune innato, utiliza diversos receptores para reconocer y responder a los agentes patógenos, reconociendo directamente las superficies de éstos uniéndose a patrones repetidos, por ejemplo carbohidratos, lípidos, etc.⁽⁹⁾; Estos receptores también tienen un papel importante en la señalización de respuestas inducidas responsables de la inflamación local, el reclutamiento de nuevas células efectoras, la contención de la infección local y la iniciación de una nueva respuesta inmune adaptativa. Tales señales pueden ser transmitidas a través de varios receptores, existiendo una familia de receptores de señalización, conocidos como los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés), que permiten una vía de señalización por reconocimiento de estructuras moleculares asociadas a los patógenos (PAMP) ^(9,10,11). Los receptores tipo Toll son glicoproteínas transmembranales de tipo I, que representan un puente entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, ya que la activación del sistema inmune innato induce la fagocitosis, la opsonización y la producción de mediadores de la inflamación, bloqueando la diseminación del patógeno; al estar los TLR expresados en las células presentadoras de antígeno (APC), tras reconocer a sus ligandos, se activan e inducen moléculas que participan en la presentación de péptidos antigénicos sobre su superficie, que posteriormente mediante MHC los péptidos son reconocidos por las células T antígeno específicas, uniéndose así la respuesta inmune innata y la adaptativa ^(9,10,11).

En el ojo, la expresión y funcionalidad de los TLR's ha sido principalmente estudiado en tejido corneal. Sin embargo los TLR también están distribuidos en la úvea^(13,14,15). Estudios en murinos reportaron que la estimulación de TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9, en iris y cuerpo ciliar genera expresión de citocinas inflamatorias⁽¹⁶⁾. Se ha demostrado que el HIPE expresa

TLR4 que al ser estimulado por lipopolisacáridos expresa citocinas inflamatorias en presencia de CD14₍₁₅₎.

El estudio y caracterización de las hEPI, resulta difícil *in vivo*, por lo tanto, se necesita de su reproducción *in vitro* para corroborar y ampliar la información ya comentada previamente acerca de su participación en la respuesta inmunológica. Existen pocos reportes en la literatura sobre cultivo de iris, sin embargo en los estudios publicados al respecto, la metodología reportada por Takaaki en 2009 para el cultivo de hEPI, incluye la utilización de medio de cultivo RPMI 1640 completo adicionado con 10% de suero fetal bovino, 10 milimoles de HEPES, 2 milimoles de glutamina, penicilina y estreptomicina; y la obtención de las muestras de iris de pacientes que se les realizó trabeculectomía con glaucoma primario de ángulo abierto (excluyendo glaucomas secundarios), que usaran al menos un medicamento antiglaucomatoso siempre y cuando no utilizaran esteroides tópicos ni sistémicos. Las muestras se incubaron en PBS con 1mg/ml de dispasa y 0.05 mg/ml de DNasa I a 37° C por 1 hora, el tejido se trituró varias veces con agujas de 18, 21 y 23 gauge, hasta obtener de células individuales en suspensión. Las células del hEPI se lavaron dos veces con RPMI 1640 y se cultivaron a 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (HR) a 37°C, luego las células en suspensión se trasladaron a placas de cultivo de 96 pozos y haciendo cambio de medio 2 veces por semana. Las células adherentes fueron consideradas como viables y las que no se adherían como muertas₍₁₎.

En 2011 Rebecca C. Froen y cols., obtienen muestras de ojos de cadáveres y de iridectomías de pacientes con glaucoma intratable mediante terapia farmacológica, reportando la siguiente metodología: Los iris de los cadáveres los disecaron y crecieron en medio Leibowitz-15, y el tejido obtenido mediante iridectomía se transfirió inmediatamente al mismo medio después de la cirugía. Separaron el epitelio del estroma con un raspador y los incubaron en EDTA 0.05% por 5 minutos para una disgregación celular. La suspensión resultante se pasó por un colador de 70 micras antes de pasarlos a medio DMEM/F12 con HEPES Buffer, suplemento B27, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento básico de fibroblastos, heparina, penicilina y estreptomicina,

después se pasaron a tubos con superficies no adherentes a 37°C con colagenasa y hialuronidasa por 40 minutos, seguidos de tripsina-EDTA por 2-4 min.

Para la monocapa adherente se pasaron las células a placas de cultivo con suero fetal de cabra (FCS) 1%. Una vez crecidas en la placa se procedió a separarlas con EDTA al 0.05% Para inducir la diferenciación, las suspensiones de células individuales fueron puestas sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-Ornitina y se cultivaron sin factores de crecimiento con 3% FCS, B27, vitamina A y laminina por 3 semanas. ⁽¹²⁾

V. Planteamiento del problema

Se han descrito en el HIPE mecanismos correspondientes a la respuesta inmune adaptativa para el mantenimiento del inmunoprivilegio ocular, sin embargo los mecanismos relacionados a la respuesta inmune innata, sobre todo los relacionados a la expresión y activación de TLR's, se han estudiado principalmente en la córnea, teniendo poco conocimiento de la participación del HIPE.

VI. Justificación

Aunque para muchas líneas de investigación el cultivo de diferentes células, de varios tejidos humanos es algo cotidiano, son muy pocos los reportes de cultivos de células de iris, por lo cual es necesario estandarizar la metodología reportada para el cultivo *in vitro* de estas células y ajustarla a las condiciones de nuestro laboratorio, con el fin de poder continuar con la caracterización fenotípica y de expresión de TLR's de las mismas, siendo más específicos en la caracterización de las células del hEPI para complementar los estudios sobre su participación en el mantenimiento del privilegio inmunológico intraocular.

VII. Hipótesis

Las células de epitelio pigmentario de iris humano, serán viables en un cultivo *in vitro* y expresarán receptores tipo Toll.

VIII. Objetivo General

El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de TLR's en las hEPI, por una técnica de cultivo celular *in vitro* desarrollada en la Fundación Hospital de Nuestra Señora de la Luz IAP.

IX. Objetivos específicos:

- Estandarización de la metodología para la realización del cultivo de células de iris humano.
- Realización del cultivo para obtención de células viables de epitelio pigmentario iridano humano
- Caracterización de células de epitelio pigmentario iridiano humano.

X. Material y Métodos:

Material y reactivos

Placas de cultivo celular de 96 pozos (Corning Incorporated Costar^R, New York); tubos cónicos de 1.5,l (Eppendorf RAININ^R, CA); Medio RPMI 1640 (Gibco^R, New York), Dispasa II (Dispase^RII); ADNasa (marca de la ADNasa); suero fetal bovino (Gibco^R, New York); HEPES (Gibco^R, New York); glutamina (Gibco^R, New York); penicilina (Gibco^R, New York) y estreptomina (Gibco^R, New York), sales para preparar PBS (Phosphate Buffered Saline); anticuerpos monoclonales: anticuerpo anticitoqueratina 12 (K12), anti-vimentina, anti-p63 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), conjugado a estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticuerpos anti TLR's 2, 4 y 9 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); incubadora (Sanyo CO² incubator); microscopio invertido (VistaVision); centrifuga para tubos Eppendorf; citómetro de flujo (FACS Canto II).

Tejido iridiano humano

Se utilizaron muestras de tejido de iris, obtenidos de pacientes sometidos a trabeculectomías que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto, utilización de medicamentos antiglaucomatosos, siempre y cuando no utilizaran esteroides tópicos o sistémicos. Sin restricción en relación a sexo, edad, raza o condición social de los pacientes. Se excluyó cualquier tipo de glaucoma secundario sobre todo los relacionados a procesos inflamatorios o uveícticos.

Cultivo primario de hEPI

Las muestras de iris obtenidas en el acto quirúrgico se colocaron inmediatamente en tubos Eppendorf con PBS-dispasa(1mg/ml)-DNAsall(0.05mg/ml), para digestión enzimática en incubadora a 37°C. Los tiempos utilizados para digestión enzimática de diferentes muestras fueron 1, 3 y 4 horas. Posteriormente se procedió a la disgregación mecánica, la cual se

realizó pasando el fragmento varias veces por el interior de una jeringa con aguja de calibre 23 y 25G; los fragmentos más pequeños de tejido obtenidos posterior al procedimiento se colocaron en otro recipiente con PBS, para posteriormente someterse a lavado y centrifugado con medio de cultivo RPMI 1640 por duplicado, finalmente se resuspendieron las células colocando 200 μ l en cada pozo de la placa de cultivo, incubándose en una atmósfera de 37°C, con 95% HR, 5% CO₂ en placas de cultivo, cambiando el medio cada tercer día. Para una de las muestras se utilizó el medio RPMI 1640 sin complementos adicionales y para el resto de las muestras el medio se adicionó con 10% de suero fetal bovino, HEPES 10mM, glutamina 2mM, penicilina y estreptomicina.

Obtención de las células cultivadas.

Se utilizó tripsina-EDTA 0.25/0.03% durante 5 minutos, vigilando la disgregación celular con microscopio invertido. Posteriormente la reacción enzimática se detuvo con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado.

Citometría de flujo

Las células obtenidas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo. Se realizaron incubaciones con anticuerpos dirigidos contra K12 y vimentina y TLR's 4 y 9, siguiendo la metodología descrita por Jiménez-Martínez et al. Se adquirieron 5000 eventos por duplicado en un citómetro de flujo evaluando las características fenotípicas en una ventana de tamaño grande vs granularidad celular, presentando los resultados en imágenes dot-plot (software CELLQUEST^R).

XI. Resultados:

Estandarización del cultivo

La muestra fue obtenida de iridectomías durante trabeculectomías en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, colocando el tejido en tubos Eppendorf con PBS enzimático: PBS-dispasa(1mg/ml)-DNAsal(0.05mg/ml).

El tiempo de digestión enzimática fue de 3 horas en PBS enzimático, en una atmósfera de 37°C, con 95% HR, 5% CO₂. La disgregación mecánica se realizó con jeringa y aguja de 25G, los fragmentos más pequeños de tejido obtenidos posterior al procedimiento se colocaron en otro recipiente con PBS, para posteriormente someterse a lavado y centrifugado por duplicado, con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, HEPES 10mM, glutamina 2mM, penicilina y estreptomicina, finalmente se resuspendieron las células colocando 200µl en cada pozo de la placa de cultivo, incubándose en una atmósfera de 37°C, con 95% HR, 5% CO₂ en placas de cultivo, cambiando el medio cada tercer día. La expansión de las células fue evaluada por microscopio invertido.

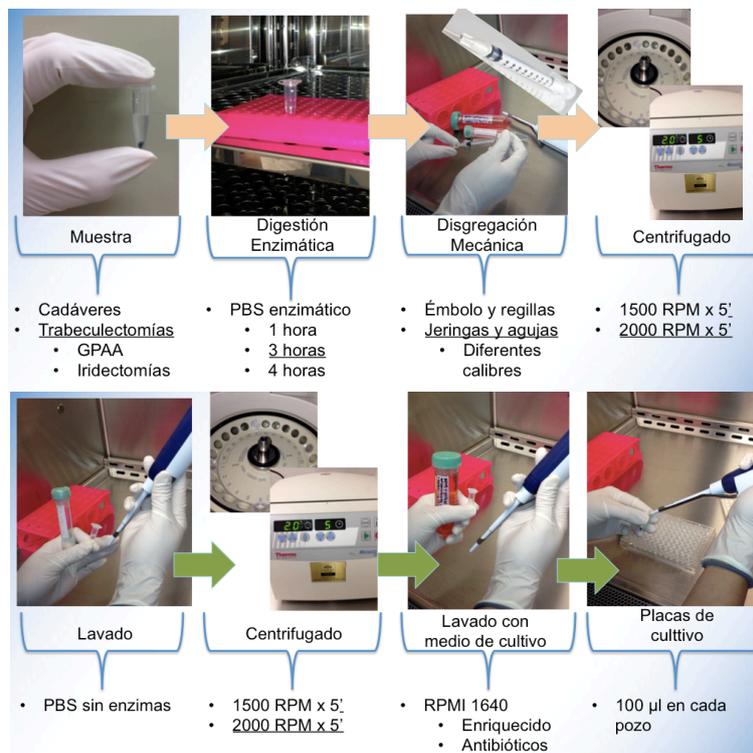


Figura 1. Estandarización del cultivo in vitro de las HIPE

Las células epiteliales migraron desde los fragmentos de tejido aproximadamente a los 8 ± 3 días, siendo adherentes y confluentes a los 28 ± 7 días.

Desde la primera semana se observó una tendencia a formar cúmulos esféricos de fragmentos pigmentados, los cuales estaban formados por estructuras circulares, pigmentadas y pequeñas, que migraban desde estructuras tubulares pigmentadas, que podrían confundirse con fragmentos aun de tejido, sin embargo a la segunda semana se retiraron los fragmentos macroscópicos de tejido y estas estructuras tubulares pigmentadas persistían a incluso aumentaban en número, posterior al primer pase de las células se observó que continuaban formándose estas estructuras tubulares pigmentadas, de las cuáles salían fragmentos circulares pequeños que migraban y se adherían a la placa de cultivo, siendo confluentes con el paso del tiempo con otras estructuras circulares, pigmentadas, pequeñas. También se observaban intercalados redes tubulares que perdían pigmento.

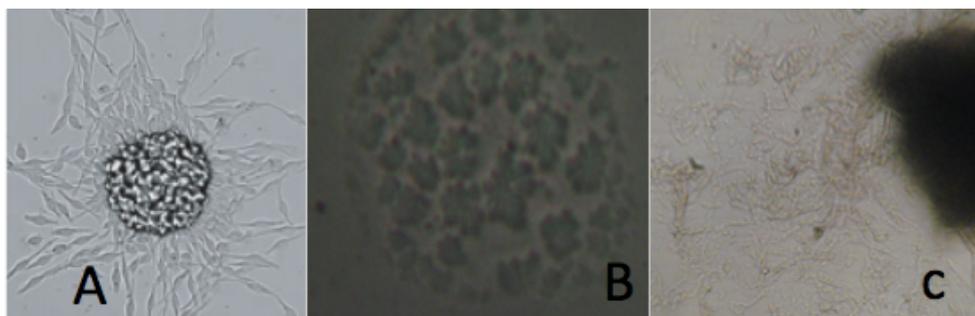


Figura 2 Monocapa de células adherentes y confluentes epiteliales de hEPI. A Fotografía tomada del artículo original de Rebecca C. Froen y Cols., quienes la describen como la apariencia de la monocapa de células epiteliales de hEPI obtenidas de iridectomías periféricas. B y C nuestro seguimiento fotográfico a las 2 semanas reportó el mismo patrón reportado por Rebecca C. Froen y Cols.

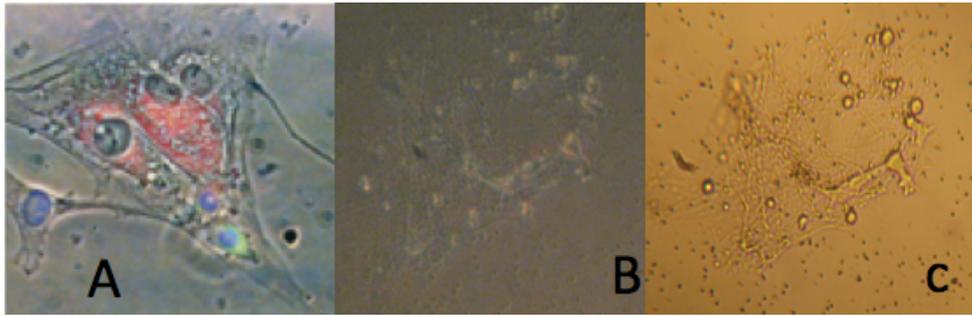


Figura 3 Migración celular a partir de esferas pigmentadas. A Fotografía tomada del artículo original de Rebecca C. Froen y Cols., B y C, nuestro seguimiento fotográfico que muestra migración de fragmentos tubulares y ligeramente pigmentados a partir de esferas pigmentadas o fragmentos de tejido pigmentado.

Caracterización fenotípica

El fenotipo de las células cultivadas *in vitro* fue evaluado por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra citoqueratina y vimentina. La expresión de K12 fue del 14.2%, y la expresión de vimentina fue del 15.3%.

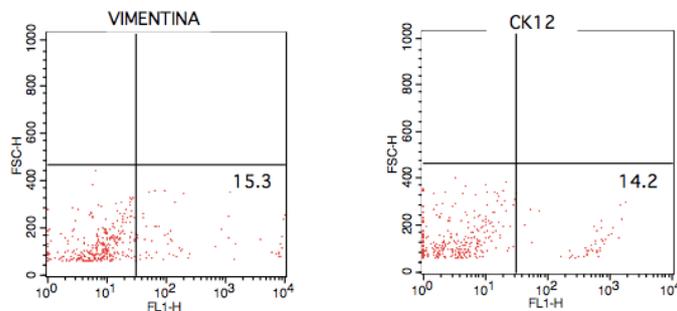


Figura 4 Expresión de vimentina y CK12 en las hEPI. Citometría de flujo de las células postcultivo. Las células fueron marcadas con anticuerpos fluorescentes, como se describió en Material y Métodos y se realizó el análisis por granularidad y tamaño celular.

Expresión de TLR's

La expresión de TLR's fue evaluada mediante citometría de flujo. Se realizaron incubaciones con anticuerpos dirigidos contra TLR's 2, 4 y 9, obteniendo un 18.2% para TLR 2, 34.5% para TLR 4 y 80.3 para TLR 9.

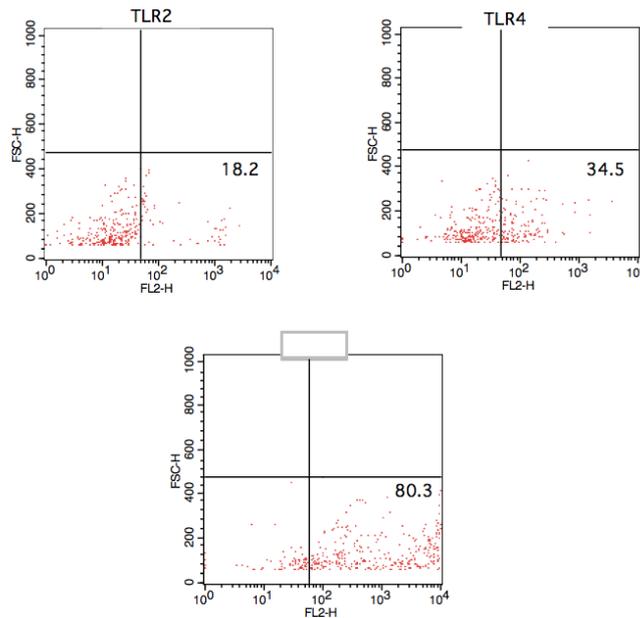


Figura 5 Expresión de TLR's. Citometría de flujo de las células postcultivo. Las células fueron marcadas con anticuerpos fluorescentes, como se describió en Material y Métodos y se realizó el análisis por granularidad y tamaño celular. Arriba y a la izquierda expresión de TLR-2, arriba y a la derecha expresión de TLR-4 y abajo expresión de TLR 9.

XII. Discusión

Si bien es cierto que existe poca información a cerca del tema, Takaaki y cols., en 2009 ⁽¹⁾, obtuvieron células *in vitro*, procedentes de muestras obtenidas de trabeculectomías de pacientes con glaucoma, las cuales cultivaron durante 2 semanas a 2 meses en RPMI 1640 enriquecido, reportando crecimiento de células epiteliales a las 2 semanas y reportan despigmentación y apariencia de fibroblasto hasta los 2 meses; Weimer EG y cols., en 2000 reportan en su cultivo de EPI división celular a los 5.4 ± 0.7 días, mostrando confluencia después de 14.7 ± 4.92 días; Rebecca C. Froen y cols., en 2011, reportan proliferación de esferas muy pigmentadas después de 4 a 5 días de cultivo, después de varios pases tales, algunas esferas perdían su apariencia pigmentada vistas al microscopio, pero algunas continuaban fuertemente pigmentadas; describen la migración de células a partir de estas esferas, así como que permanecían presentes tales esferas posterior a digestión enzimática.

Lo reportado por estos autores con respecto al tiempo de crecimiento, adherencia de las células y la presencia de esferas pigmentadas y migración a partir de fragmentos pigmentados, coincide con lo que nosotros mostramos en resultados, y es clara la semejanza entre las fotografías del artículo original de Rebecca C. Froen y cols., en 2011, con las imágenes de nuestro seguimiento fotográfico.

Takaaki y cols., en 2009 reportan que a las 2 semanas el 95% de las células era positivas a citoqueratina, sin especificar qué tipo de citoqueratina; Froen y cols en 2011 reportan positividad del EPI para CK-19 y vimentina. Las citoqueratinas evaluadas en nuestro estudio fueron positivas, así como la vimentina; las muestras que fueron sometidas al análisis de citoqueratinas tenían 4 semanas de cultivo.

Al ya contar con la estandarización del cultivo y al haberlo ajustado a las condiciones de nuestro laboratorio, podemos continuar con nuevos protocolos que necesiten de células de hEPI obtenidas *in vitro*, siendo de sumo interés

para nosotros continuar con la línea de investigación hacia la expresión de los TLR's; sobre todo analizar si existe actividad inmunológica en ellos, para obtener más información acerca de la participación del iris en el privilegio inmunológico ocular, sobre todo lo concerniente a la respuesta inmune innata.

Este estudio no solo es de importancia para nuestra línea de investigación, ya que de aquí pueden surgir nuevos protocolos de estudio que involucren iris, que no solamente tengan enfoque en el factor inmunológico.

XIII. Conclusión

Comprender los mecanismos que participan en el privilegio inmunológico ocular, puede llevarnos a entender los mecanismos para combatir la tan temida inflamación intraocular, actualmente tenemos mayor conocimiento de los mecanismos que involucran a la respuesta adaptativa, sobre todo lo concerniente a la córnea y los factores presentes en la cámara anterior, sin embargo poco es el conocimiento de la participación de otras estructuras intraoculares, sobre todo la participación de la respuesta inmune innata, por lo tanto al encontrar TLR'S en las células de hEPI, debemos estimularlos por técnicas *in vitro* para determinar su actividad.

XIV. Referencias

1. Takeshi Kezuka, Yoshihiko, Yoko Okunuki, Masaru Takeuchi, Katsuhiko Maruyana. Human iris pigment epithelial cells suppress T-cell activation via direct cell contact. Takaaki Hattori,. *Experimental eye research* 2009. 89 358-364.
2. Kazuhiro Ishida, Noorjahan Panjwani, Zhiyi Cao, J. Wayne Streilein. Ocular Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege, 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-Cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Immunology and inflammation – 2003* Vol. 11 No.2 p.p 91-105.
3. Gabriele Thumann, MD. Development and cellular functions of the iris pigment epithelium.. *Survey of ophthalmology* 2001. Vol. 45, number 4, January-February.
4. Sunao Sugita. Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege.. *Arch Immunol. Ther. Exp.*, 2009, 57, 263-268.
5. Wilbanks, G.A. Mammolenti, M. Streilein, J.W. *Eur J. Studies en the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) III, Induction of ACAID depends upon intraocular transforming growth factor-beta.. Immunol* 1992. 22, 165-173.
6. Namba, K. Kitachi. N., Nishida. T Taylor A.W. Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha- melanocyte- stimulating hormone and transforming growth factor-beta 2. *J Leukoc Biol* 2002. 72, 946-952.
7. Taylor. A.W. Streilen J.W. Cousins S.W. Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potencial immunosuppressive factor in aqueous humor. *Curr. Eye Res.* 1992. 11, 1199-1206.
8. Cultured human retinal pigment epithelial cells differentially express thrombospondin -1 -2 -3 and -4 *Int. Biochem Carron* J.A. Hiscott P. Hagen. S. Sheridan C.M. Magee. R. Gallagher. J.A. *Cell. Biol* 2000. 32, 1137-1142.
9. Charles A. Janeway, Jr. *Inmunobiología, el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2ª Edición Española.* Masson. ISBN 84-458-1176-2

10. Sánchez-Zauco NA, Giono-Cerezo S, Maldonado-Bernal C. Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. Salud Publica Mex. 2010;52:447-454.
11. M. Mesa-Villanueva, P.J. Patiño. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. Inmunología 2006. Vol. 25 / Núm 2/ Abril-Junio: 115-130
12. Rebecca C. Froen. Erick O. Johnsen. Pigment epithelial cells isolated from human peripheral iridectomies have limited properties of retinal stem cells. Acta Ophthalmol. 2011: 89: e635-e644.
13. J H Chang, P J McCluskey, D Wakefield. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. Br J Ophthalmol 2006;90:103-108
14. J H Chang et al. Recent advances in Toll-like receptors and anterior uveitis. Clinical and experimental Ophthalmology 2012; 40: 821-828.
15. Jeanie J. Y. Chui. Et al. Iris pigment epithelial cells express a functional lipopolysaccharide receptor complex. IOVS, May 2010, Vol. 51 No5.
16. Jordan J. Allensworth et al. Investigation of the differential potentials of TLR agonist to elicit uveitis in mice. Leukoc. Biol. 90: 1159-1166; 2011.