



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CULTIVO DE CÉLULAS TRONCALES DE LIMBO
CORNEAL SOBRE LENTE DE CONTACTO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

OFTALMÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ CORZA

**DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA JESSICA ARIADNA CARMONA HERNÁNDEZ**

**COASESOR
DR. JULIO GRANADOS MONTIEL**

**COASESOR
DR. CARLOS LANDA SOLÍS**

**COASESOR
Dr. Everardo Esteban Barójas Weber**



MÉXICO D. F.

AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

MARCO TEORICO.....	2
RESUMEN DEL PROYECTO.....	2
ANTECEDENTES.....	4
FIGURA 1.- CELULAS TRONCALES DE LIMBO CORNEAL.....	5
FIGURA 2.- CAUSAS DE INSUFICIENCIA LIMBICA.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
HIPOTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	11
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	11
CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN.....	11
MUESTRA.....	12
METODOLOGIA.....	13
ANALISIS ESTADISTICO.....	23
RESULTADOS.....	24
ANEXOS.....	33
VARIABLES DE ESTUDIO.....	34
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	36
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

RESUMEN DEL PROYECTO:

La insuficiencia límbica es una patología que provoca alteraciones en la reparación epitelial corneal, provocando defectos epiteliales persistentes, neovascularización, cicatrización, ulceración, perforación y ceguera. En la actualidad no se cuenta con un tratamiento adecuado que contrarreste el aporte insuficiente o la ausencia de células epiteliales del limbo corneal. El cultivo y posteriormente trasplante de células madre del limbo corneal, es el tratamiento ideal para tratar la insuficiencia. Los resultados serán registrados en una hoja de Excel. Se determinaran medidas de tendencia central y dispersión, frecuencias y porcentajes. Se aplicara la prueba de T- Student/U de Mann Whitney dependiendo la distribución de las variables evaluadas (Prueba de Smirnov Kolmogorov). Los datos se analizaran con el programa SPSS versión 19, se tomara el valor de $p < 0.05$ como significancia estadística y un intervalo de confianza del 95%. Desde el punto de vista bioético se trabajara bajo la NOM-087.

MATERIAL Y METODOS: En este estudio experimental se tomaran los remanentes de tejido que contengan células epiteliales de limbo corneal de pacientes sometidos a extracción extracapsular de catarata en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Posteriormente en la unidad de ingeniería de tejidos, se va a disgregar mecánicamente el tejido. Se realizará cultivo por explante (cultivo 1°) en una caja de 25 cm² con medio DMEN con 10% suero humano. Después de 2 semanas de cultivo, las células se van a expandir a primer pase en dos cajas de 75cm², una vez alcanzada la confluencia se van a separar las células de la caja

de cultivo y se van a tomar 3 alícuotas para análisis : 1.-la primera para citometria de flujo para receptores CD90 CD117 CD73 CD47, 2.- de la segunda se va a extraer RNA para PCR en tiempo real para los siguientes genes p63, ck12, ck14, ck19. 3.- La tercera se dividirá en tres para colocar en tres diferentes lentes de contacto, se van a sembrar 2.5×10^5 células, hasta que alcance 90% de confluencia, una vez alcanzada la confluencia se va analizar la viabilidad con el kit life /dead. Y por último de uno los tres fragmentos tomaran muestras para realizar: citometria de flujo para CD90, CD117, CD73, CD47, y para extraer RNA, para PCR en tiempo real para los siguientes genes p63, ck12, ck14, ck19. Desde el punto de vista bioético se trabajara bajo la NOM-087.

ANTECEDENTES

Las células madre se caracterizan por su potencialidad y plasticidad, es decir la habilidad de dar origen a múltiples líneas celulares y a diferenciarse en distintos tipos celulares. Son una pequeña subpoblación del total del tejido. Potten y Loeffler las definen por sus atributos funcionales, como células indiferenciadas capaces de: proliferar, auto-mantenerse, producir un gran número de progenie diferenciada y funcional y regenerar el tejido posterior a un daño.(1)

Las células madre del limbo son pobremente diferenciadas, de ciclo celular corto pero con una gran capacidad para la expansión y división. Están confinadas a su "nicho", con localización en las palisadas de vogt, donde el micro ambiente le da soporte, mantiene sus características y ofrece un grado de protección. En el caso de las células madre del limbo, la división celular es asimétrica, una de las células hijas se mantiene como su progenitora, y sirve para la renovación de células madres, la otra hija está destinada a dividirse y diferenciarse, también conocida como "**célula amplificadora transitoria**", la cual se divide más frecuentemente que la célula madre, pero tienen un potencial proliferativo limitado y son consideradas el paso inicial para la diferenciación final. (1)

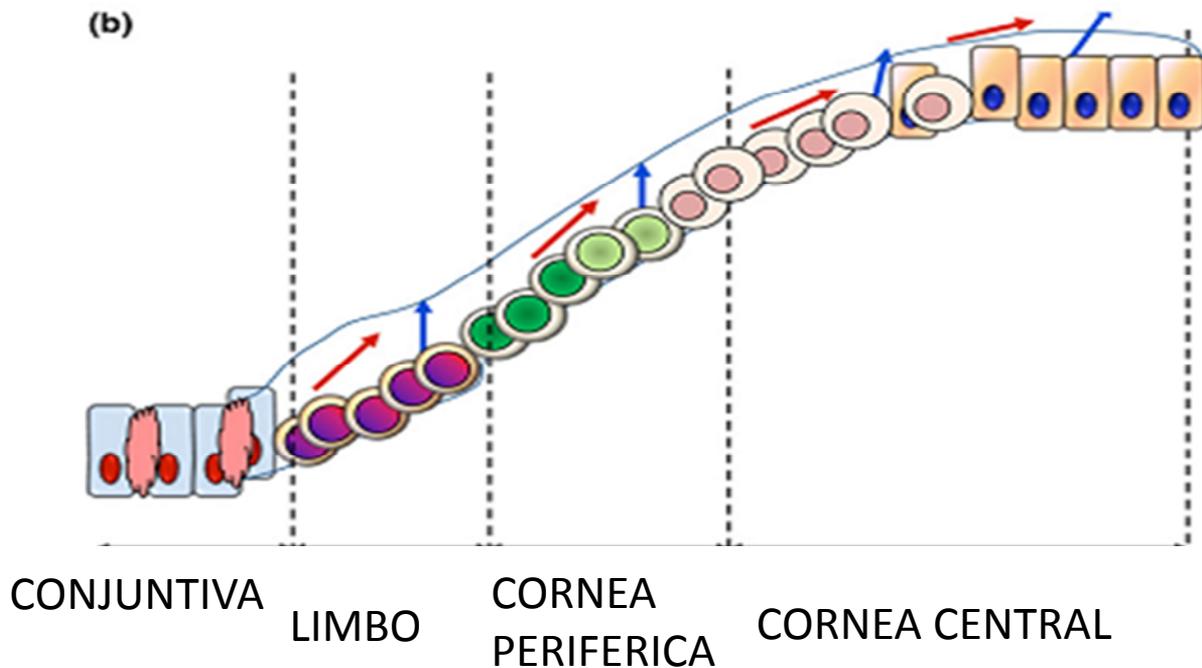


Figura1.- células troncales del limbo corneal

STEM CELL THERAPIES FOR OCULAR SURFACE DISEASE /SAJJAD AHMAD, SAI KOLLI, MAJLINDA LAKO, FRANCISCO FIGUEIREDO AND JULIE T. DANIELS / DRUGS DISCOVERY TODAY /VOLUME 15, NUMBERS 7/8 / APRIL 2010

Diversas patologías y agresiones externas pueden provocar la destrucción de estas células, dando lugar a una entidad que se define como síndrome de insuficiencia límbica (SIL), la cual altera la capacidad regenerativa del epitelio corneal. (2) Clínicamente cursa con inflamación crónica, defectos epiteliales, ulceración, vascularización, cicatrización, en casos graves incluso perforación, que en conjunto ocasionan opacidad corneal y mala calidad de visión.

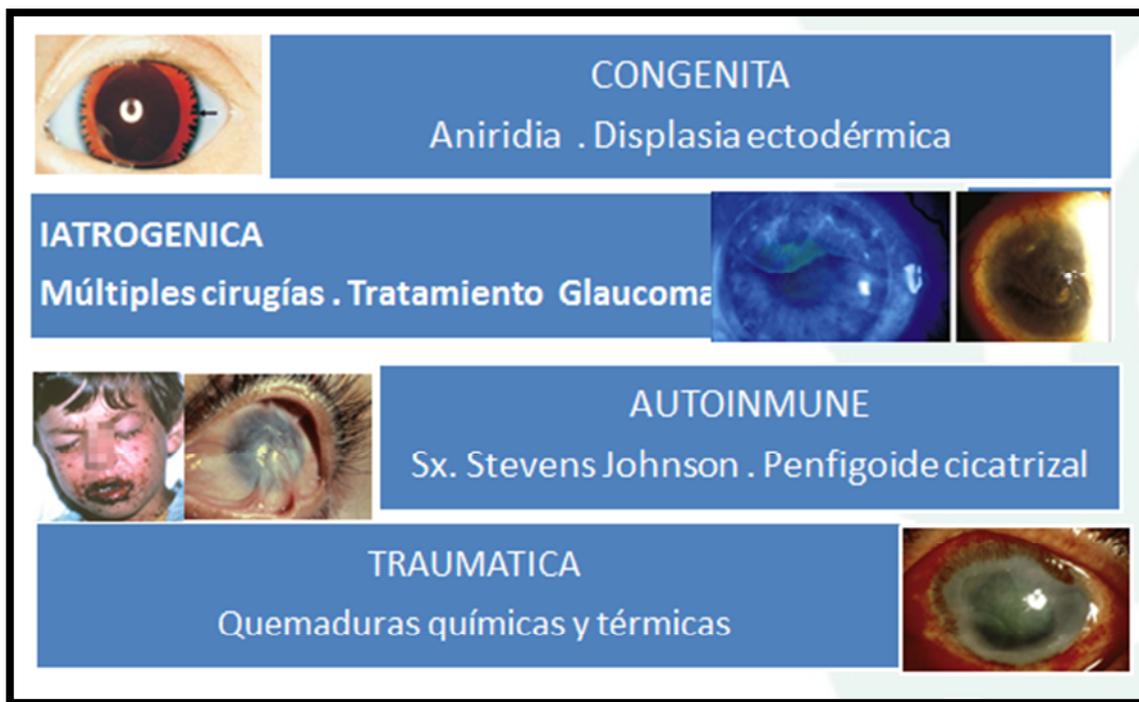


Figura 2.- Causas de Insuficiencia Limbica

Existen diversas técnicas propuestas para la reconstrucción de la superficie ocular secundaria a insuficiencia límbica. Cuando el daño es unilateral, se propone trasplantar tejido limbar del ojo contralateral sano. Si la afectación es parcial y unilateral, puede utilizar limbo del mismo ojo. (3-5). Sin embargo, cuando hay una destrucción límbica total o parcial, bilateral, se ha de recurrir al trasplante de tejido limbar alogénico, ya sea de un donador vivo relacionado o de un cadáver

La tasa de éxito del trasplante de limbo autólogo varía en distintas publicaciones, siendo ésta aproximadamente de un 81%, con períodos de seguimiento de entre 6 y 14 meses. La tasa de éxito del trasplante de limbo alogénico en artículos publicados es muy distinta ya que depende de varios factores entre los que destaca la etiología de la insuficiencia límbica, que generalmente es de origen autoinmune, ocasionando afección bilateral y un mayor proceso inflamatorio. Puede ser tan baja como un 7.1% hasta un 33%. Además de tener la desventaja de la necesidad de tratamiento inmunosupresor durante un largo periodo de tiempo para evitar el rechazo (2). Actualmente existen otras opciones de tratamiento, como es el cultivo de células madre ex vivo, ya sea del propio paciente o de donador vivo (6)

Para realizar cultivos de células madre del limbo corneal se requiere determinar su inmunofenotipo. En 2008 Landa Solís y colaboradores en el Instituto Nacional de Rehabilitación lograron cultivar y caracterizar las células madre limbares cultivadas en amnios humano gamma (60Co) radio esterilizado. Al establecer su inmunofenotipo, se determinaron los marcadores que expresan la células madre del limbo corneal y estos son : los anticuerpos CD 73, CD90, las proteína citoqueratinas Ck12, Ck14 y Ck19 y P63. (7). Este estudio es la base para posteriormente realizar trasplante de células troncales.

Dentro del empleo de andamios para el cultivo de las células madre del limbo corneal uso de la membrana amniótica introduce notable variabilidad biológica en crecimiento celular, el amnios es semiopaco, es costoso y requiere equipo especializado a para su preparación y almacenamiento (8). Por lo tanto, es necesario producir una alternativa mediante ingeniería tisular, recientemente se han utilizado lentes de contacto para cultivo trasplante de las células epiteliales del limbo corneal. Entre los estudios realizados en lentes de contacto: Di Girolamo, Chui, Wakefield, et al en 2007 realizaron Un método para cultivar epitelio de la superficie ocular humana en lentes de contacto de contacto que pueden facilitar la expansión y la transferencia de las células epiteliales límbicas autólogas.

JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia límbica es un problema nacional de salud de gran magnitud. De ser exitosa esta investigación, brindara las bases para realizar trasplante autólogo y/o alógeno de células de limbo corneal; la trascendencia sería muy grande ya que incidiría en 3 líneas prioritarias de investigación del Instituto que son: TRASPLANTES, QUEMADURAS y DISCAPACIDAD POR ALTERACIONES SENSORIALES.

Se cuenta con todos los equipos para el cultivo de estas células así como los reactivos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Se crearía un vínculo prioritario entre el Servicio de Oftalmología y la Unidad de Ingeniería de tejidos. Esta investigación tiene el potencial de enriquecer los conocimientos mundiales existentes y ulteriormente solucionar el problema de salud de la insuficiencia límbica que engloba varias patologías de la córnea.

Debido a lo anterior esta investigación cumple a cabalidad con los criterios de factibilidad, viabilidad y originalidad.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La insuficiencia límbica es una patología que provoca alteraciones en la reparación epitelial corneal, provocando defectos epiteliales persistentes, inflamación, neovascularización, cicatrización, ulceración, perforación y ceguera. En la actualidad no se cuenta con un tratamiento adecuado que contrarreste el aporte insuficiente o la ausencia de células epiteliales del limbo corneal, por lo tanto creemos que es posible que las células troncales del limbo corneal cultivadas sobre lente de contacto, conserven su genotipo y fenotipo de células pluripotenciales y por lo tanto preserven su actividad biológica.

HIPÓTESIS

Las células troncales del limbo corneal cultivadas sobre lente de contacto, conservarán su genotipo y fenotipo de células pluripotenciales y por lo tanto conservaran su actividad biológica, lo que permitirá su posible aplicación clínica en casos de insuficiencia límbica.

OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar y cultivar sobre lente de contacto las células troncales del limbo corneal, conservando sus propiedades biológicas, para la realización de trasplantes autólogos y/o alógenicos para la regeneración de la cornea

.- Descripción del universo de trabajo

Criterios de inclusión

Pacientes sometidos a extracción extracapsular de catarata en el INR

Pacientes sin enfermedades crónico - degenerativas

Pacientes que acepten participar en el protocolo

Pacientes que firmen la carta de consentimiento informado

Criterios de eliminación

Tejido contaminado por bacterias, hongos o virus

-Criterios de exclusión

Pacientes sin enfermedades crónico – degenerativas

Pacientes con glaucoma

Pacientes con síndrome de ojo seco

Pacientes que no acepten participar en el protocolo

Pacientes que no firmen la carta de consentimiento informado

- Tamaño de muestra

Cuatro remanentes de limbo corneal por cirugía extracapsular de catarata de 2 x
2mm

Estudio experimental

METODOLOGIA

Diseño del estudio experimental *in vitro*

Se tomaron dos muestras de pacientes que sometidos a extracción extracapsular de catarata previa firma de consentimiento informado, las toma de muestra se realizara por cirujano oftalmólogo especialista en cornea, se tomaran 2 x 2 mm de la región superior en el meridiano de las 12, y se colocara en medio DMEN (GIBCO Cat. 11330 – 332) con 1% de antibiótico antimicótico (GIBCO Cat. 15240 – 062) , posteriormente se transportara de inmediato a la unidad de ingeniería de tejidos del instituto Nacional de Rehabilitación.

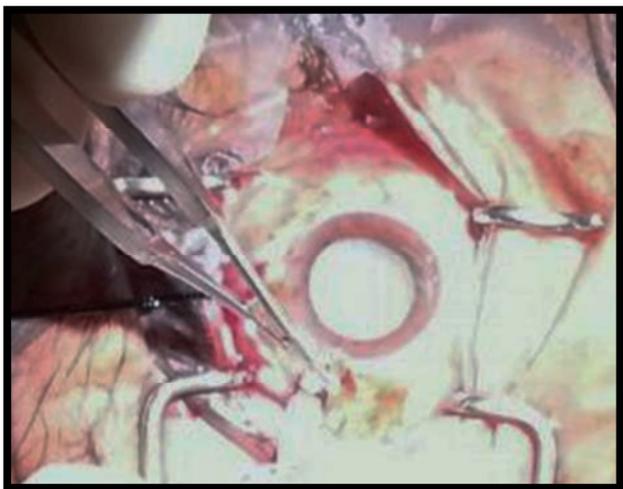


Figura 3.- Toma de muestra de limbo corneal



Figura 4.- Muestra de limbo corneal

Procesamiento de la muestra

Fue preparada para su procesamiento bajo condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo (Thermo Electron Corporation modelo 1284 serie 101783) (. Una vez dentro de la campana de flujo la muestra fue colocada sobre una caja petri desechable donde se realizó fragmentación mecánica de la muestra, con mango de bisturí No. 3 con hoja de bisturí No. 15.

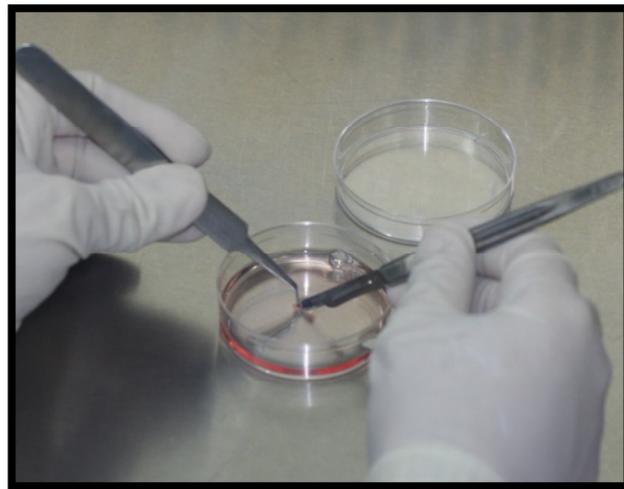


Figura 5.- Fragmentación mecánica de la muestra

La muestra fue fragmentada en 4 partes, cada una de las cuales se colocó en una caja de cultivo de 25cm^2 adicionándole 5mL de medio DMEN/F12 preparado [DMEN/F12 (GIBCO Cat. 11330 – 032), 10% suero humano, 1% antibiótico – antimicótico (GIBCO Cat.15240-062)].se realizó cultivo del explante a 37°C en una atmósfera 5% de CO_2 y 95% de humedad.



Figura 6.- Explante en caja de 25cm^2

Posterior a dos semanas de cultivo al alcanzar el 90% de la confluencia Se fueron separadas de la caja de cultivo utilizando EDTA [53mM] al 2.5% tripsina (GIBCO Cat. 25200), y se expandieron a primer pase en cajas de 150cm^2

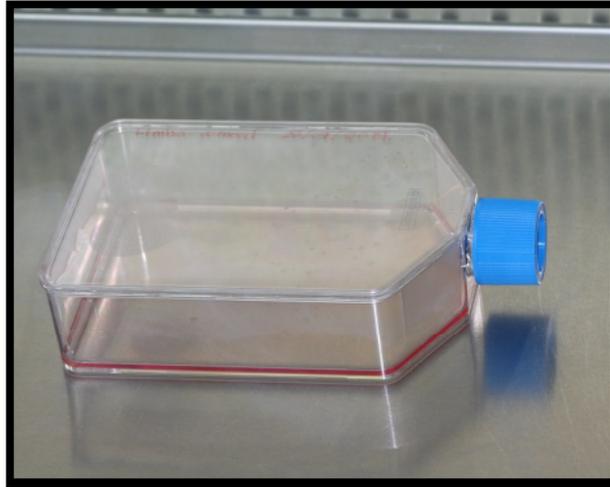


Figura 7.- Primer pase caja de 150cm^2

Una vez alcanzada la confluencia del 90% las células fueron maracadas para citometría de flujo para establecer el inmunofenotipo

Cuantificación celular

Se tomaron 10 mcrolitros del boto celular con una micropipeta (Pipet –life Rainin) en medio DMEN/F12 preparado y 10 mcrolitros decolorante azul tripano (GIBCO Cat. 15250-061) colocando ambos en una placa de 96 pozos agitándolos con la misma punta de micropipeta, se tomaron 10 microlitros de dicha suspensión en el pozo y se colocaron en la celda de una cámara d Nubauer, colocando está 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:

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

Donde:

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 sobre lente de contacto

Una vez determinada la cantidad de células en cada caja, dentro de una campana de flujo laminar, se tomaron 250,000 células para realizar la citometría de flujo, el resto de las células se cultivaron hasta formar una monocapa la cual fue colocada sobre 3 diferentes tipos de lentes de contacto blandos de hidrogel de Silicón (Pure visión 2, Optix Air, Acuve advance) en una caja de 24 pozos, adicionándole 2mL de medio DMEM/F12 preparado en cada pozo, manteniendo

condiciones de esterilidad, las células fueron cultivadas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Tambien se cultivaron células sobre lentes de contacto cubiertos con gelatina al 70%.



Figura 8.- Cultivo sobre lente de contacto en caja de 24 pozos.

Viabilidad celular.

Para comprobar que la viabilidad de las células sobre los lentes de contacto , se adiciona calceína a la caja , la calceína es un reactivo que posee una actividad fluorescente desarrollada sólo cuando hay actividad metabólica de las células vivas 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 los lentes de contacto blandos, 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 CO_2 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 las células estaban vivas.

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, fl3 y fl4)

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 tabla 1 :

Se utilizó el siguiente panel de anticuerpos:

- CD90, CD73: Expresión positiva de célula troncal mesenquimal.
- CD105: Expresión positiva de célula troncal mesenquimal.
- fibroblastos

Tubo de ensaye	Panel de anticuerpos
1	Autofluorescencia
2	CD105/ CD73/Fibroblastos/CD90

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).

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.

Extracción de RNA

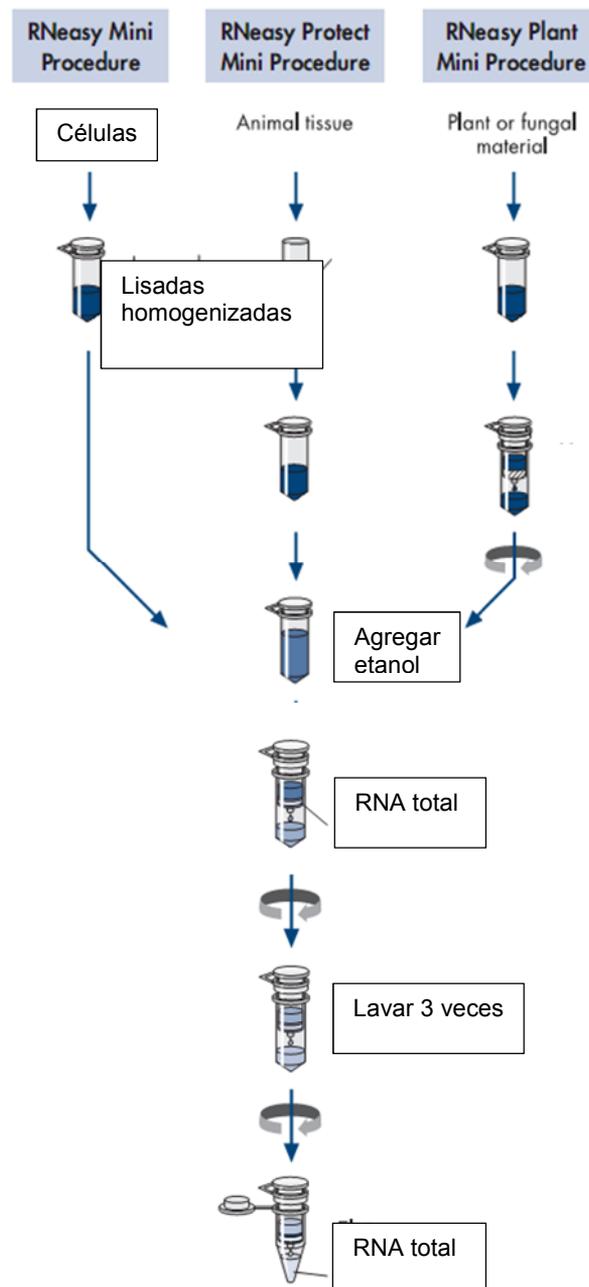


Figura 8.- Extracción de RNA
RNeasy mini handbook / september 2010/ Qiagen

Por biología molecular , para determinar la expresión de genes característicos de células troncales y epiteliales (anexo 3). Se obtendrá RNA para PCR en tiempo real para los siguientes genes:

- p63:
- ck12 y ck14: Expresión de linaje epitelial
- ck19: Expresión de célula troncal

Análisis estadístico propuesto

Los resultados serán registrados en una hoja de Excel. Se determinarán medidas de tendencia central y dispersión, frecuencias y porcentajes. Se aplicará la prueba de T- Student/U de Mann Whitney dependiendo la distribución de las variables evaluadas (Prueba de Smirnov Kolmogorov). Los datos se analizarán con el programa SPSS versión 19, se tomará el valor de $p < 0.05$ como significancia estadística y un intervalo de confianza del 95%.

Estudio experimental observacional, únicamente se realizará estadística descriptiva e inferencial para las variables cuantitativas.

Se utilizará

RESULTADOS

EXPLANTE

En las Figuras del 9 al 12 se muestran fotografías de los explantes obtenidos a partir de las muestras de limbo corneal

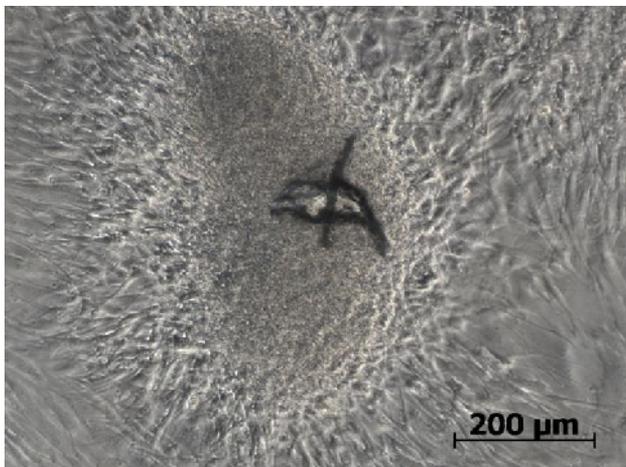


Figura 9.- Explante

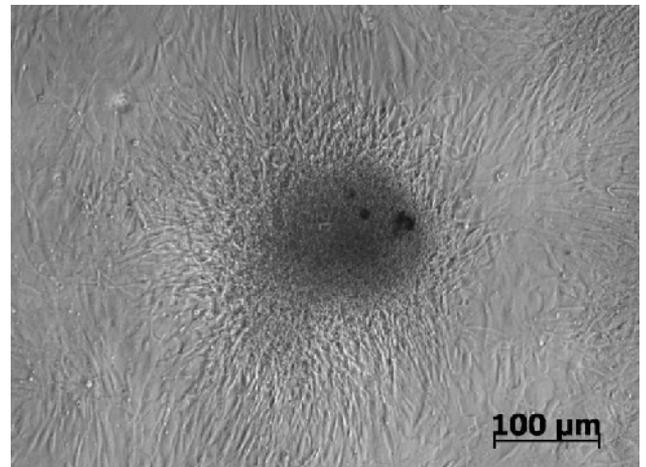


Figura 10.- Explante

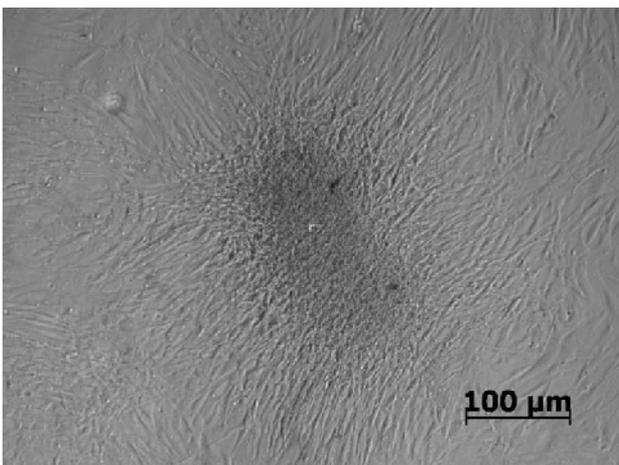


Figura 11.- Explante

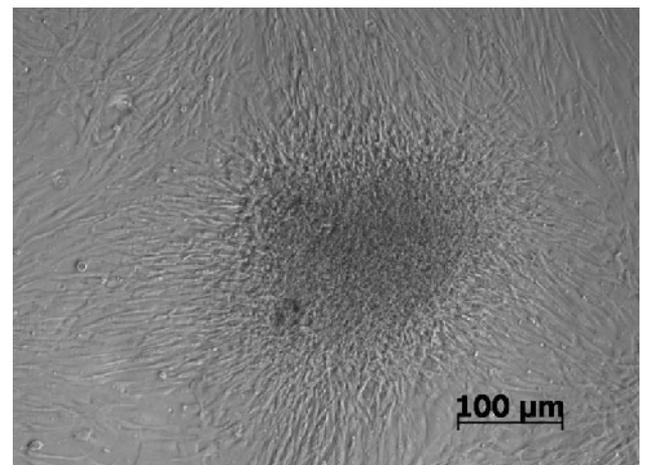


Figura 12.- Explante

MONOCAPA

En las figuras de la 13 a la 19 se muestran fotografías de las monocapas obtenidas durante el primer paso del cultivo celular

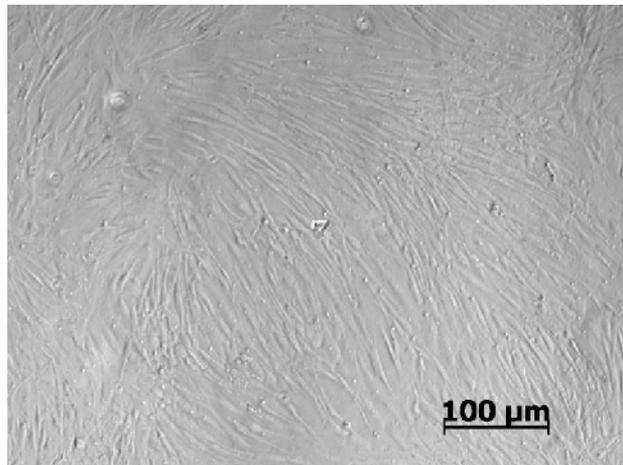


Figura 13.- Monocapa

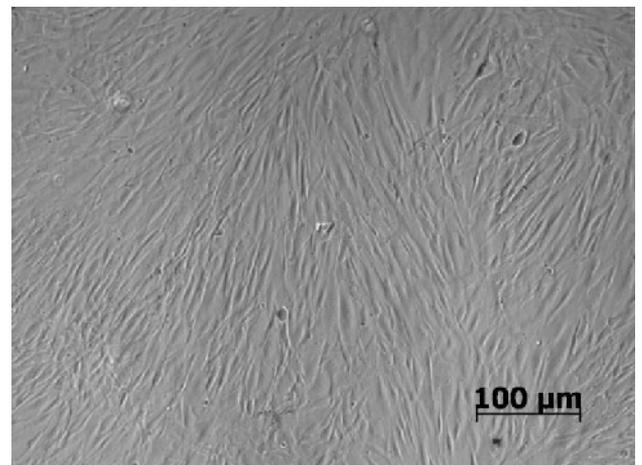


Figura 14.- Monocapa

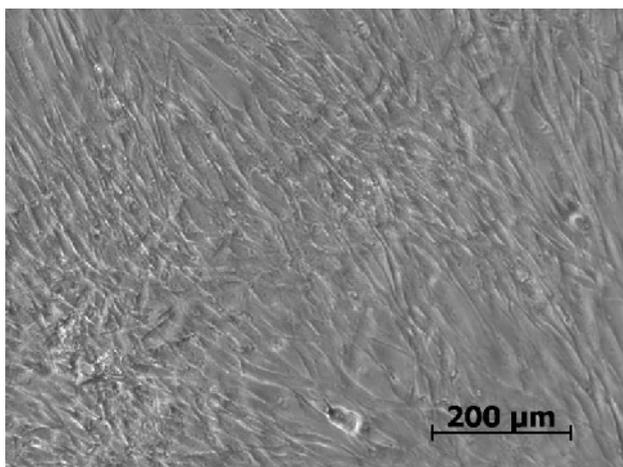


Figura 15.- Monocapa

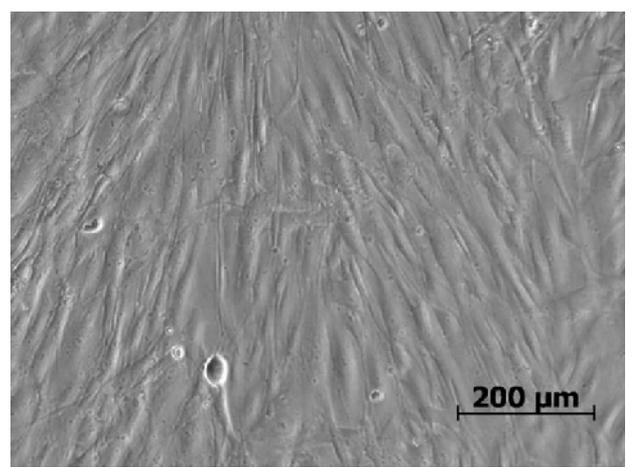


Figura 16.- Monocapa

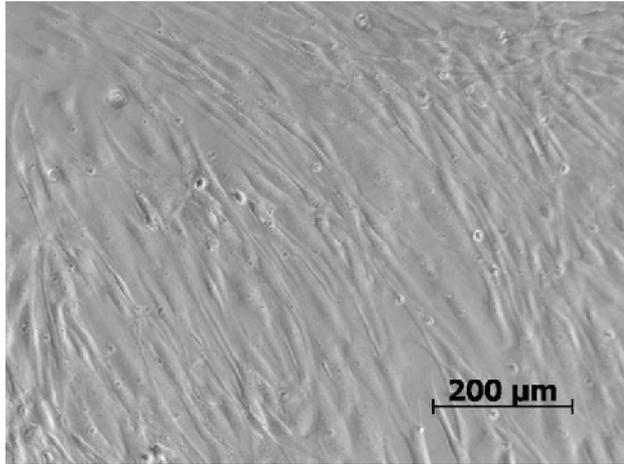


Figura 17.- Monocapa

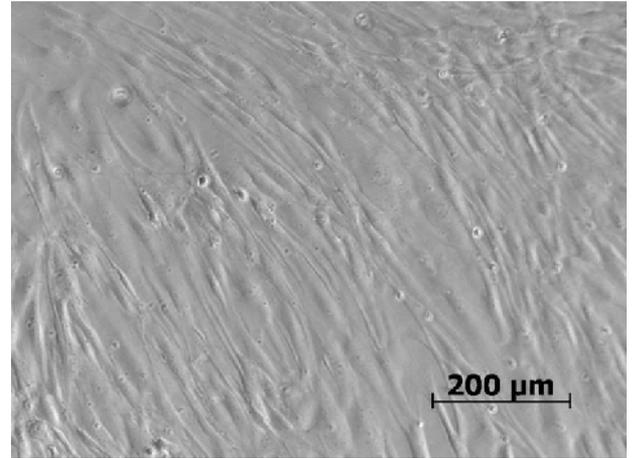


Figura 18.- Monocapa

CULTIVO SOBRE LENTE DE CONTACTO

En la figuras 19 y 20 se muestran el cultivo celular de 1000 células por lente.

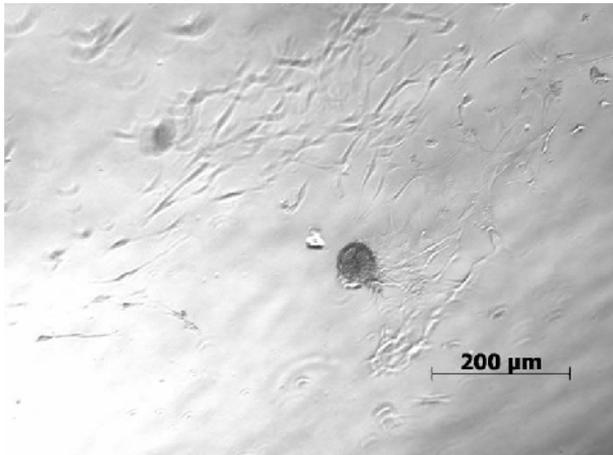


Figura 19.- Cultivo en lente de contacto primer semana.

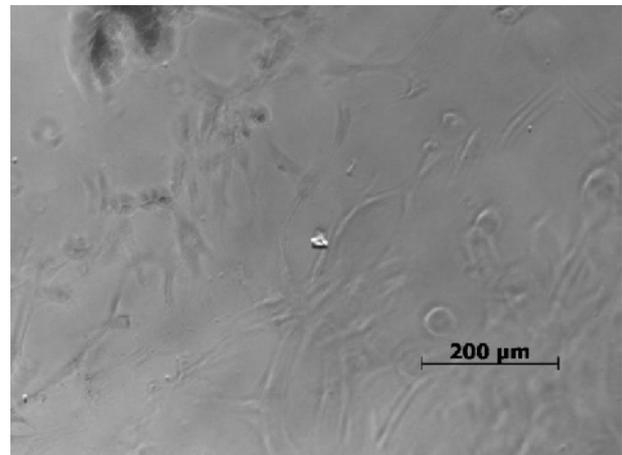


Figura 20 .- Cultivo en lente de contacto primer semana.

En las figuras 21 y 22 se muestras el cultivo células de 250 mil células por lente

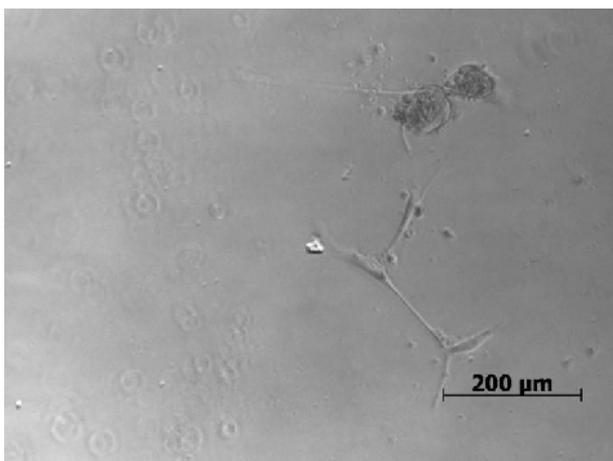


Figura 21- Cultivo en lente de contacto segundo dia.

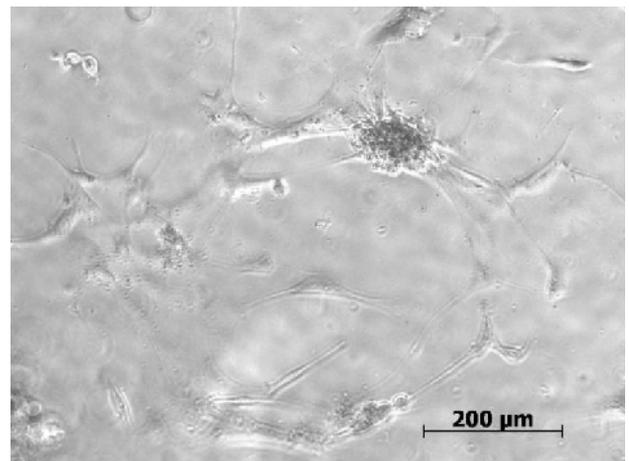


Figura 22.- Cultivo en lente de contacto segunda semana

En las figuras 23 y 24 se muestran el cultivo de células de 500 mil células por lente

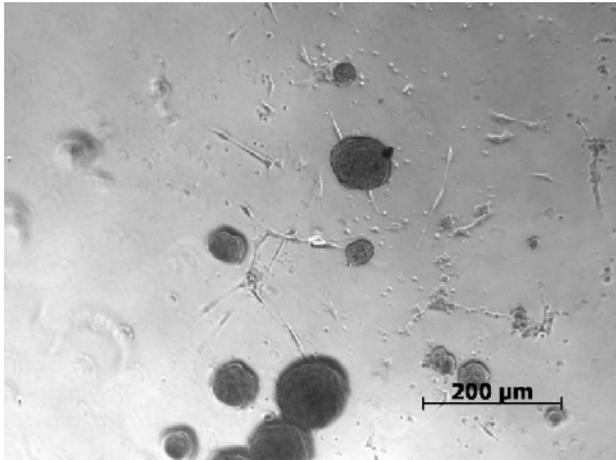


Figura 23 .- Cultivo en lente de contacto primer semana.

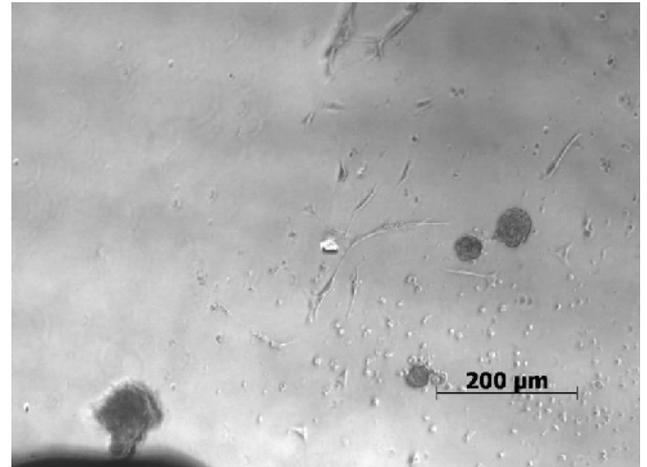


Figura 24 .- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

En las figuras 25 a 28 se muestran los resultados a las dos semanas de cultivo de la monocapa de células de limbo corneal sobre lente de contacto.

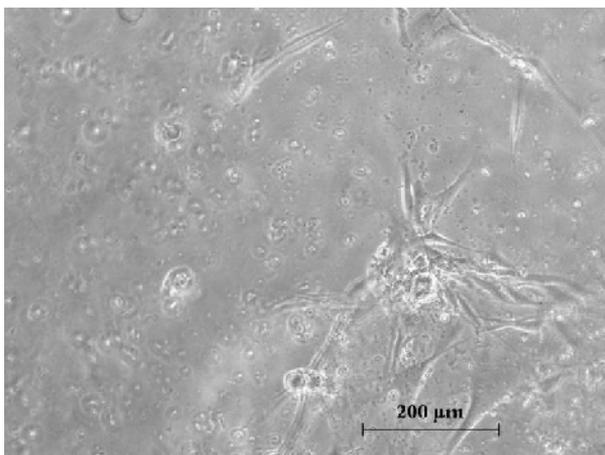


Figura 25 .- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

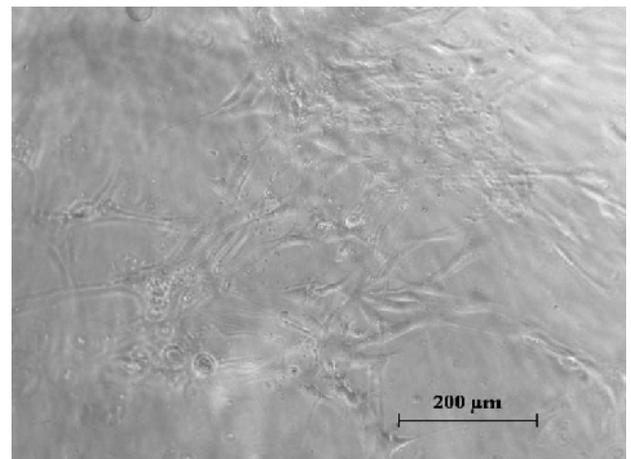


Figura 25 .- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

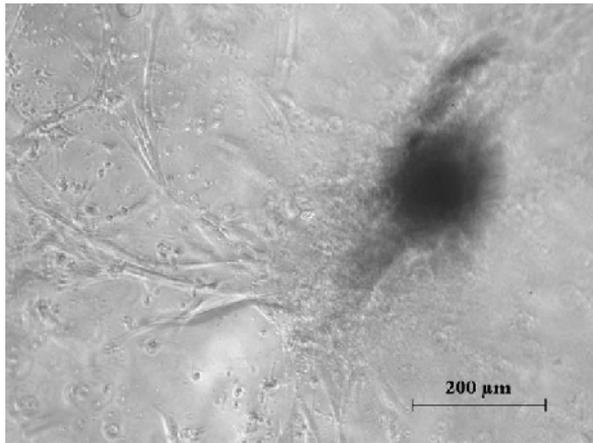


Figura 27 .- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

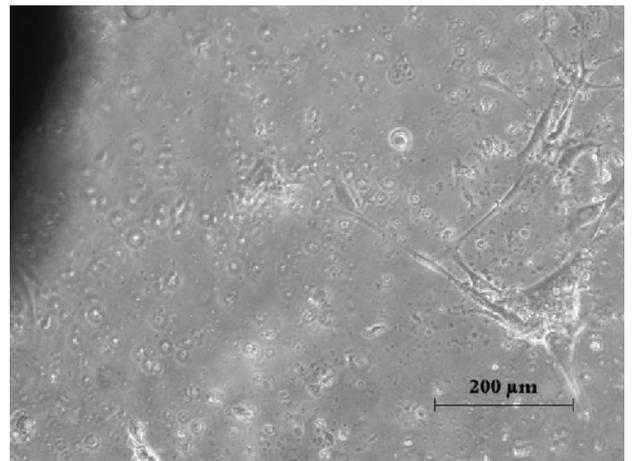


Figura 28 .- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

En las figuras 29 y 30 se muestran los resultados del cultivo de las células troncales cubierto con gelatina al 70%

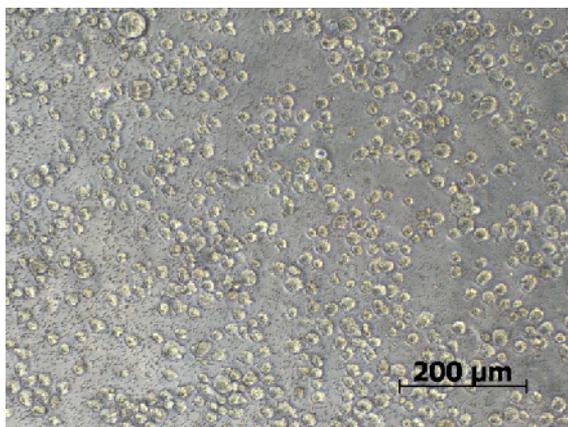


Figura 29.- Cultivo en lente de contacto segunda semana.

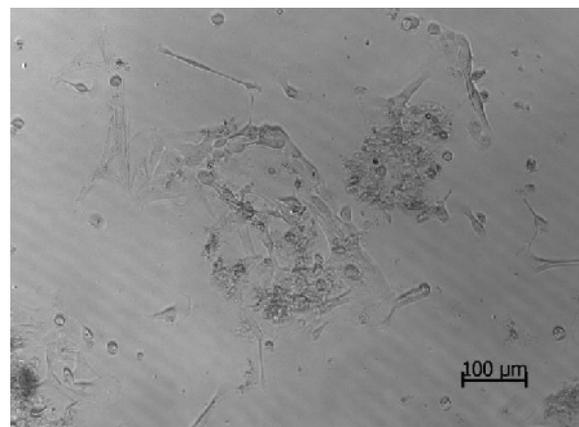


Figura 30.- Cultivo en lente de contacto primer semana.

CITOMETRIA DE FLUJO

El pico con la línea oscura representa la autofluorescencia de las células, el pico de color verde representa el porcentaje de células positivas al respectivo marcador de superficie.

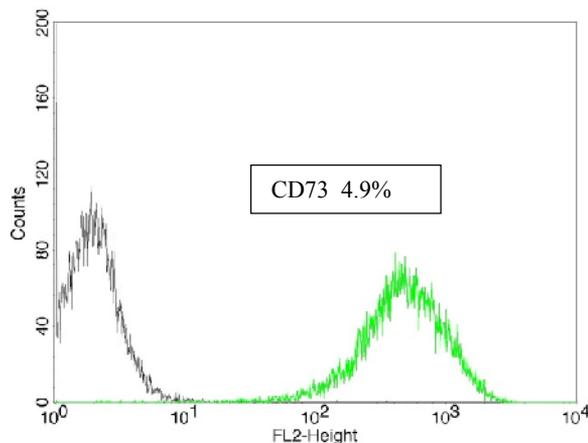


Figura 33.- .Anticuerpo CD73.

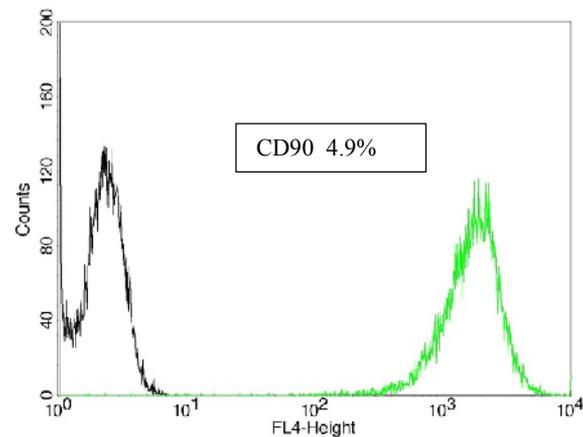


Figura 34.- .Anticuerpo CD90.

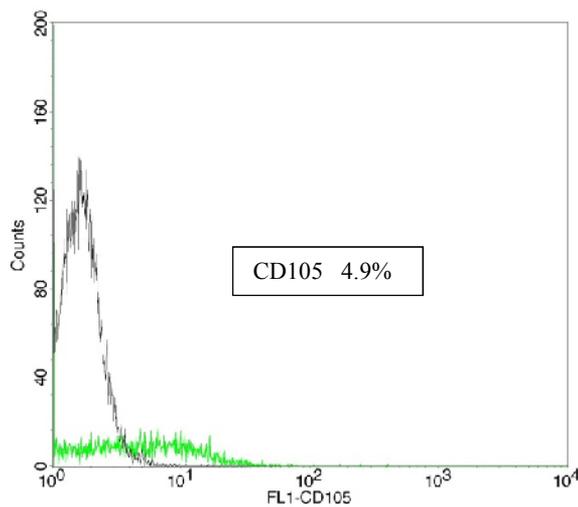


Figura 35.- .Anticuerpo CD105.

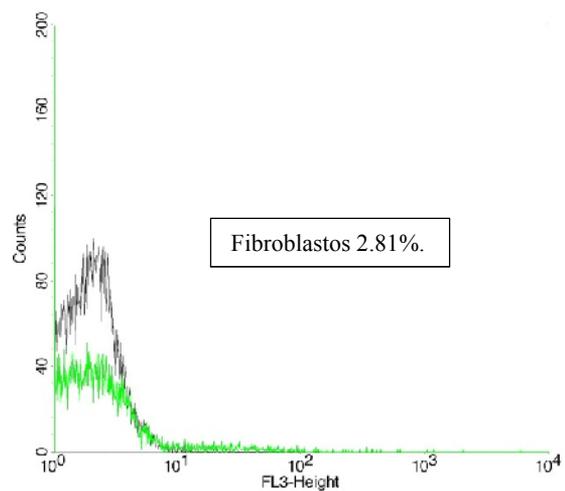


Figura 36.- .Marcador de fibroblastos

DISCUSION

Las células troncales de limbo corneal, conservaron su inmunofenotipo al pasar a primer pase y al ser cultivadas sobre lentes de contacto blando.

Se observo una mejor adhesión y proliferación celular en los lentes cubiertos con gelatina al 70%.

CONCLUSIONES

Durante nuestro estudio se logró cultivar células troncales de limbo corneal sobre lentes de contacto de hidrogel de Silicón, las células conservaron su inmunofenotipo; Sin embargo la confluencia fue del 25%. El recubrimiento del lente de contacto sobre lente tratado con gelatina al 70% se observó mayor adhesión y proliferación de células troncales sobre lente de contacto. La gelatina altas concentraciones como en nuestro caso al 70%, puede ser una alternativa para el cultivo de células troncales de limbo corneal.

ANEXOS

VARIABLES

Variable	Definición Operativa	Tipo de variable	Unidad de medición
Edad del donador	Tiempo transcurrido desde el nacimiento	Numérica continua	años
Genero del donador	Diferenciación sexual	Cualitativa dicotómica	Masculino/ femenino
Expresión positiva de célula troncal mesenquimal CD90	Presencia de receptor en la membrana celular, mediante citometria de flujo	Numérica continua	Número de Células (porcentaje)
Expresión de célula troncal mesenquimal receptor CD117	Presencia de receptor en la membrana celular, mediante citometria de flujo	Cualitativa dicotómica	+/-
Expresión positiva de célula troncal mesenquimal CD73	Presencia de receptor en la membrana celular, mediante citometria de flujo	Cualitativa dicotómica	+/-
Expresión negativa de célula mesenquimal	Presencia de receptor en la membrana celular, mediante citometria de flujo	Cualitativa dicotómica	+/-

VIABILIDAD CELULAR

En las figuras 29 a 32 se muestran fotografías tomadas con microscopia confocal donde se observa la viabilidad de las células.

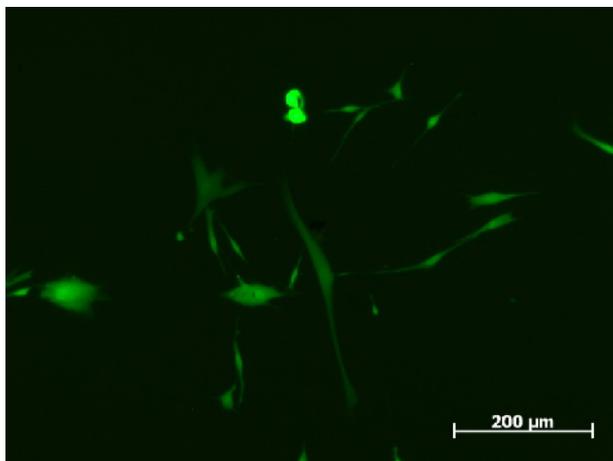


Figura 29 .- células viables positivas a calceína

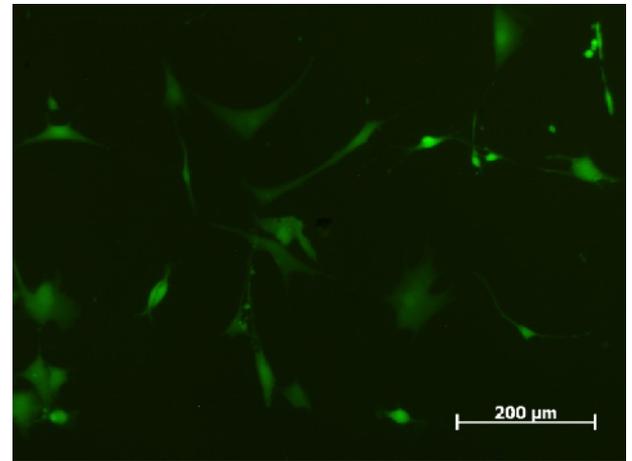


Figura 30 .- células viables positivas a calceína

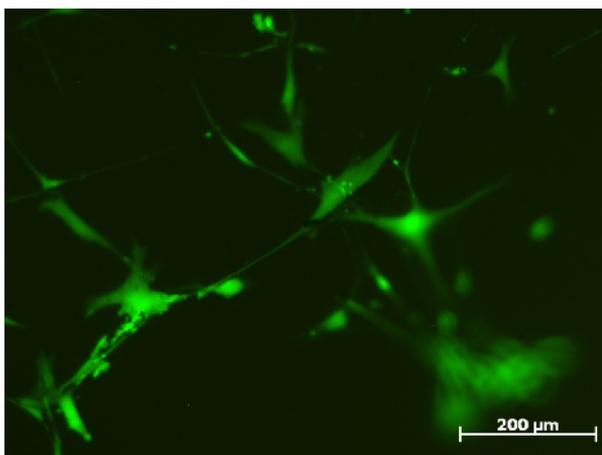


Figura 31 .- células viables positivas a calceína

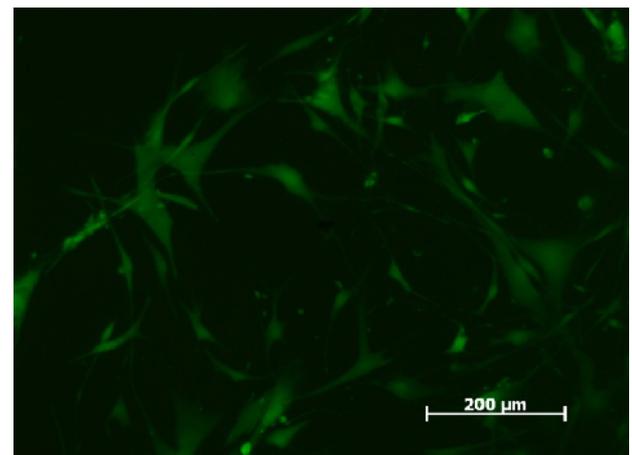


Figura 32 .- células viables positivas a calceína

CD47

Expresión positiva de proliferación del gen p63. Presencia de receptor en la membrana celular, por medio de RT-PCR en tiempo real. Cuantitativa Copias de DNA

Expresión positiva de diferenciación linaje epitelial ck12. Presencia de receptor en la membrana celular, por medio de RT-PCR en tiempo real. Cuantitativa Copias de DNA

Expresión positiva de diferenciación linaje epitelial ck14 Presencia de receptor en la membrana celular, por medio de RT-PCR en tiempo real. Cuantitativa Copias de DNA

Expresión positiva de linaje troncal ck19 Presencia de receptor en la membrana celular, por medio de RT-PCR en tiempo real. Cuantitativa Copias de DNA

ANTES DE LLENAR ESTE FORMATO LEA CUIDADOSAMENTE

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION DE DONACIÓN DE CELULAS DE LIMBO CORNEAL

LLÉNESE CON LETRA DE MOLDE LEGIBLE O A MAQUINA

En la ciudad de _____ del día ____ del mes _____ del año _____.

Yo _____, me identifico con _____ Número _____, de _____ años de edad, por lo tanto con mayoría de edad, en pleno uso de mis facultades mentales, libre de coacción física o moral, manifiesto que es mi voluntad donar en forma altruista y sin ánimo de lucro 2x2 mm, de tejido del limbo corneal, remanente de la cirugía de catarata para que sean Aclaro que recibí información completa sobre los riesgos de la operación y las consecuencias de la extracción de células del limbo corneal . Así mismo autorizo al grupo de investigación para que realicen todos los estudios, procedimientos necesarios para el protocolo de investigación.

DATOS DEL DONADOR O DISPONENTE:

NOMBRE	TELEFONO	
DOMICILIO	COLONIA	C.P.
DELEGACIÓN	CIUDAD	ENTIDAD FEDERATIVA

FIRMA DEL DONADOR

DATOS DEL 1er TESTIGO

NOMBRE	TELEFONO	
DOMICILIO	COLONIA	C.P.
DELEGACIÓN	CIUDAD	ENTIDAD FEDERATIVA

FIRMA 1er TESTIGO

	ENERO			FEBRERO			MAYO			AGOSTO		
				MARZO			JUNIO			SEPTIEMBRE		
				ABRIL			JULIO			OCTUBRE		
Revisión bibliográfica	X	X	X	X								
Obtención de remanentes del limbo corneal		X	X	X								
Cultivo de células troncales			X	X	X							
Análisis del primer cultivo					X	X	X					
Cultivo de células sobre los tres tipos de lente de contacto							X	X	X			
Análisis de cultivos en los lentes de contacto								X	X	X		
Redacción de tesis											X	
Redacción de artículo científico												X

.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dua H y Azuara-Blanco A. Limbal Stem Cell of the Corneal Epithelium. Survey of Ophthalmology 2000;44:415-425
2. Torres J, Fernández I, Quadrado MJ, et al. Estudio multicéntrico retrospectivo sobre trasplante de limbo. Arch soc esp oftalmol 2008; 83: 417-422
3. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. Eye 1993; 7: 629-633.
4. Morgan S, Murray A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. Eye 1996; 10: 349-354.
5. Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P. Limbal autografting: comparison of results in the acute and chronic phases of ocular surface burns. Cornea 1999; 18: 164-171
- 6.- Sajjad Ahmad, Sai Kolli, et. Al. / Stem Cell Therapies for Ocular Surface Disease / Drugs Discovery today /volume 15, numbers 7/8 / april 2010.
- 7.- Carlos Landa-Solís• Leticia Vázquez-Maya et. Al. / Use of Irradiated Human Amnion as a Matrix for Limbal Stem Cell Culture / Springer Science + Business media b.v. 2012.
8. - Hannah levis and Julie t Daniels / New Technologies in Limbal epithelial stem cell trnsplation / Current Opinio in biotechnology 2009 ; 20 593- 597
- 9.- Di Girolamo C., Chui J., et. Al. / Cultured human ocular surface epithelium on therapeutic contact lenses / Br J Ophthalmol 2007; **91**:459-464