



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN

CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ENTIDAD ACADÉMICA

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN "CONDE DE VALENCIANA"

Generación de injerto corneal a partir de células troncales de membrana amniótica

Tesis que para optar por el grado de Doctor en Ciencias

Presenta:

M. en C. ALEJANDRO NAVAS PÉREZ

Tutor:

Dr. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA

Comité Tutor: DR. VÍCTOR BAUTISTA DE LUCIO, DR. HIGINIO ARZATE

Ciudad de México

Agosto 2016



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.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Abstract (Resumen en inglés).....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	12
Justificación.....	15
Planteamiento del Problema.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivo General.....	17
Diseño y Tipo de Estudio.....	18
Metodología.....	18
Resultados.....	21
Discusión.....	29
Conclusiones.....	33
Referencias.....	33

El presente trabajo de investigación “Generación de injerto corneal a partir de células troncales de membrana amniótica”, fue realizado bajo la dirección del doctor **Yonathan Omar Garfias Becerra**, financiado por fondos del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** [Número CVU 277499 / Número de Beca 240417 / CONACYT SALUD 2011-1-160286; Ciencia Básica 167438] y apoyo del Patronato del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” IAP.

Resumen

Objetivo: Evaluar los efectos de las células troncales mesenquimales provenientes de membrana amniótica (hAM-MSCs, por su abreviatura en inglés) en el sistema de respuesta inmune innata y su posible utilidad como terapias regenerativas oculares.

Métodos: Se aislaron células troncales hAM-MSCs cultivadas en DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron caracterizadas utilizando anticuerpos anti-CD105, CD73, CD44, CD29 y CD45 mediante citometría de flujo. Se diferenciaron *in vitro* hacia tres linajes celulares incluyendo hepatocitos, condrocitos y neuronas. Se realizaron xenotransplantes con aplicación intracameral de hAM-MSCs en un modelo murino de quemadura corneal. Se evaluó el efecto de las hAM-MSCs en las trampas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps, NETs; por sus siglas en inglés) con microscopía de fluorescencia.

Resultados: Se obtuvieron células con morfología fibroblástica y con la capacidad de generar unidades formadoras de colonias. El fenotipo de las células fue CD105+ CD73+ CD44+ CD29+ and CD45-, lo que sugiere que se trataron de células mesenquimales. Se confirmó su habilidad de diferenciarse hacia hepatocitos, condrocitos y neuronas confirmándose con la formación de proteínas albúmina, colágeno-II y nestina, respectivamente. Los xenotrasplantes de hAM-MSCs mejoraron notablemente la transparencia de las córneas murinas previamente dañadas y se demostró una disminución del infiltrado inflamatorio. Por otro lado, se disminuyó la producción de NETs en la interacción con células polimorfonucleares de sangre periférica con el sobrenadante de hAM-MSCs.

Conclusiones: Estos datos sugieren que las hM-MSCs podrían ser aplicadas en terapias de regeneración ocular debido a que muestran propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias.

Palabras clave: células troncales, cicatrización, reparación corneal, regeneración corneal.

Abstract

Purpose: To evaluate the effect of human amniotic membrane mesenchymal stem cells (hAM-MSCs) over components of the innate immune system and their possible use in the regenerative ocular therapy.

Methods: Isolated hAM-MSCs were cultured in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum (FBS). hAM-MSCs were characterized using anti-CD105, CD73, CD44, CD29 and CD45 antibodies by flow cytometry. *In vitro* tri-lineage differentiation in hepatocytes, chondrocytes and neurons was performed. The xenotransplant of hAM-MSCs was intracamerally performed in a murine corneal burn model. The effect of hAM-MSCs on Neutrophil Extracellular Traps (NETs) were evaluated by fluorescence microscopy.

Results: Cells with fibroblastic morphology and the ability to generate fibroblast-colony forming units were obtained. The phenotype of the cells was CD105+ CD73+ CD44+ CD29+ and CD45-, which suggests that these cells were mesenchymal cells. Their ability to differentiate into hepatocytes, chondrocytes and neurons was confirmed by the acquisition of albumin, collagen-II and nestin proteins, respectively. The xenotransplant of hAM-MSCs significantly improved the transparency of the murine damaged corneas and reduced the inflammatory infiltrate. On the other hand the interaction of peripheral blood polymorphonuclear cells (PBPMN) with the supernatant of hAM-MSCs decreased the NETs production.

Conclusions: These data suggest that hAM-MSCs could be applied in the ocular regenerative therapy as an immunosuppressor treatment in ocular and inflammatory diseases.

Keywords: stem cells, wound healing, corneal repair, corneal regeneration.

Introducción

La córnea es un tejido avascular y transparente situado en la parte más anterior del ojo. En combinación con la esclera, forman la pared que protege al globo ocular. La córnea además permite el paso de luz y es el principal elemento de refracción para enfocar los rayos luminosos en la retina. La córnea está expuesta al exterior y en los humanos tiene un grosor aproximado de 500 micrómetros. Tiene un epitelio escamoso no queratinizado externo, una capa media estromal de tejido conectivo entre dos capas que funcionan como membranas basales, y finalmente un endotelio cuboidal en la parte más interna. (Figura 1) La alteración de cualquiera de sus capas genera opacidades y alteraciones visuales.¹

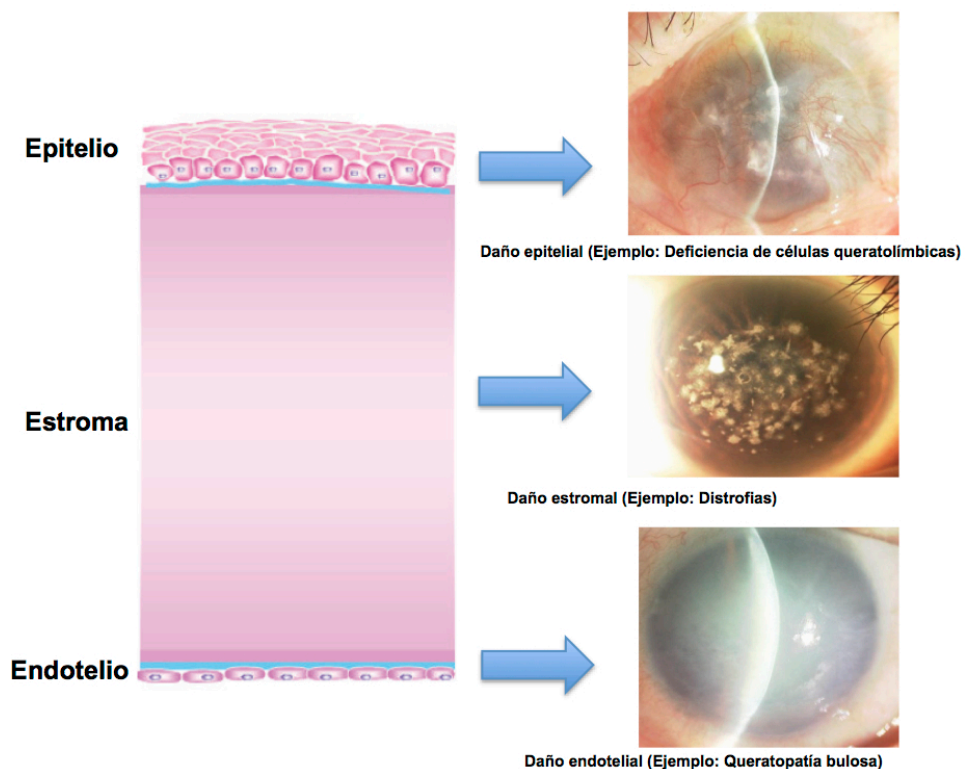


Figura 1: Estructura y ejemplos de desórdenes de la córnea. La córnea tiene cinco capas, siendo las tres principales: epitelio, estroma y endotelio. La agudeza visual y transparencia se ve afectada cuando una capa corneal está lesionada. (Modificado: Oie Y, Nishida K, Biomed Res Int 2013;2013:428247).

El epitelio corneal tiene entre cinco y siete capas, y mide alrededor de 50 micrómetros de grosor. Está compuesto de células basales pequeñas, unas células aplanadas medias conocidas como células aladas y unas células aplanadas poligonales superficiales. Se piensa que las células madre o troncales del epitelio corneal (células madre queratolímbicas) residen en la capa basal del limbo en la zona de transición entre córnea y conjuntiva, en la parte más periférica de la córnea (Figura 2). Éstas células troncales generan células amplificadoras transitorias que migran a la parte central corneal y pueden proliferar rápidamente.^{2,3}

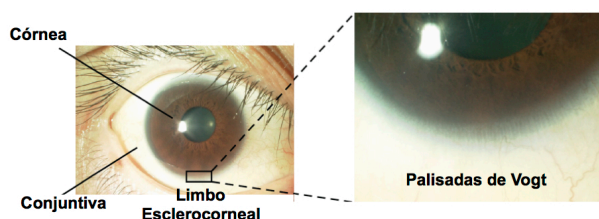


Figura 2: Palisadas de Vogt, imagen corneal mediante biomicroscopía muestra las imágenes características de las palisadas de Vogt en el limbo esclerocorneal inferior. (Modificado: Oie Y, Nishida K, Biomed Res Int 2013;2013:428247).

A pesar de no existir marcadores específicos para células troncales queratolímbicas, se han descrito algunos marcadores candidatos, tales como: p63, ABCG2 (*ATP-binding cassette subfamily G member 2*), N-caderina, citoqueratina-19, receptores de NGF (*Nerve Growth Factor*, por sus siglas en inglés) e integrina $\alpha 6$, entre otros.^{4,5,6,7,8,9}

Las palisadas de Vogt, presentan características importantes en el limbo esclerocorneal humano. Son más sutiles en población joven y altamente pigmentadas en población adulta.¹⁰ Aparentan ser mucho más predominantes en la parte inferior que en la superior, y son observadas infrecuentemente en el meridiano horizontal (Figura 3). Posteriormente, se describió un fenómeno nuevo llamado criptas limbo-epiteliales (LEC, *limbal epithelial crypts*, por sus siglas en inglés) confiriéndole el atributo de ser el nicho de las células madre queratolímbicas.^{11,12}

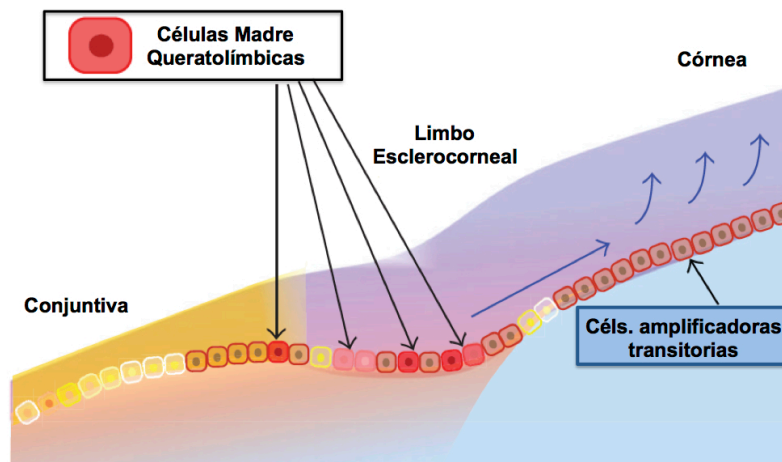


Figura 3: Células madre o troncales queratolímbicas. Se encuentran localizadas en la capa basal del limbo esclerocorneal. Las células transitorias amplificadoras son células progenitoras que se diferencian a partir de las células madres queratolímbicas en la periferia y posteriormente pueden migrar hacia la córnea central. (Modificado: Oie Y, Nishida K, Biomed Res Int 2013;2013:428247).

Ante la ausencia total de células troncales queratolímbicas, el epitelio conjuntival vascularizado invade la córnea, dicha condición es llamada

deficiencia de células troncales queratolímbicas, la cual conlleva vascularización corneal, opacidad corneal y disminución de la agudeza visual. Las causas de deficiencia de células queratolímbicas puede dividirse en cuatro grupos: 1) deficiencias congénitas (como aniridia, esclerocórnea); 2) enfermedades con causas externas o trauma (quemaduras químicas, térmicas); 3) enfermedades con involucro interno (como síndrome de Stevens-Johnson o penfigoide ocular cicatrizal), y finalmente; 4) idiopáticas.¹³

En pacientes con deficiencias unilaterales, el trasplante de limbo autólogo puede reparar la córnea afectada, sin embargo algunas veces se requieren grandes cantidades de tejido del ojo sano y se puede exponer a un riesgo en el proceso.^{14,15,16} El trasplante alogénico de células madre queratolímbicas puede realizarse tanto en deficiencias unilaterales como bilaterales, sin embargo conlleva dos problemas importantes: complicaciones postoperatorias (rechazo e infecciones, entre otras) y la escasez de donadores. Además, el trasplante alogénico requiere inmunosupresión sistémica a largo plazo con el potencial de complicaciones locales y generales, debidas al uso de medicamentos inmunosupresores. A pesar de la adecuada inmunosupresión, el rechazo de los injertos puede ocurrir sobre todo en condiciones avanzadas. En algunos países, la disponibilidad de tejidos continúa siendo una limitación importante para la aplicación de estas técnicas.^{17,18,19,20,21,22}

El establecimiento de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa han mostrado un campo promisorio en el trasplante de órganos, incluyendo la córnea y las células madre queratolímbicas.^{23,24} Los cultivos autólogos y

heterólogos de células madre limbocorneales (CLET, *cultivated limbal epithelial transplantation*, por sus siglas en inglés) consisten en expandir células queratolímbicas y colocarlas posterior al crecimiento celular.^{25,26} Para casos de pacientes con deficiencias bilaterales se ha desarrollado el cultivo de mucosa oral epitelial (COMET, *cultivated oral mucosal epithelial cell transplantation*, por sus siglas en inglés).^{27,28} Recientemente se ha descrito una técnica para deficiencias unilaterales llamada trasplante simple limbo epitelial (SLET, *simple limbal epithelial transplantation*, por sus siglas en inglés) que consiste en colocar pequeños fragmentos de limbo esclerocorneal sobre toda la superficie ocular utilizando adhesivos tisulares de fibrina y membrana amniótica como coadyuvantes.^{29,30,31,32}

Por otro lado, la membrana amniótica tiene dos porciones principales: el córion que es vascular y el amnios que es delgado, translúcido y está en contacto con el líquido amniótico.³³ El amnios tiene tres capas principales (Figura 4), y tiene un grosor de alrededor de 20 a 50 micrómetros. Anteriormente se pensaba que carecían de células madre, sin embargo se han encontrado células troncales mesenquimales con potencial para su utilización en medicina regenerativa.³⁴ El epitelio es una monocapa de células cuboidales activas con microvellosidades en su superficie apical. La membrana basal está formada de colágena tipo IV, V y VII además de fibronectina y laminina. El estroma se divide en tres capas contiguas pero distintas: la interna compacta que está en contacto con la membrana basal y contribuye con la fuerza tensil, la intermedia fibroblástica que es más gruesa y contiene una red de fibroblastos, y finalmente la capa esponjosa más externa. En oftalmología se ha utilizado ampliamente en

distintas áreas, principalmente en: enfermedades de la superficie ocular, deficiencia de células madre queratolímbicas, reconstrucción conjuntival, cirugías de pterigión, simblefaron, cirugías de glaucoma, tratamiento de perforaciones, substrato para crecimiento y expansión de células queratolímbicas, entre otras.^{35,36} Se han encontrado distintos posibles mecanismos de acción como: parche biológico mecánico;³⁷ promoción de la epitelización favoreciendo migración epitelial, reforzamiento de la adhesión y diferenciación epitelial y prevención de la apoptosis;^{38,39,40} propiedades antiinflamatorias y antifibróticas evitando la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos mediante la disminución de TGF- β , inhibición de IL-1 α , IL-2, IL-8, IFN- γ , TNF- β , factor de crecimiento fibroblástico y del factor de crecimiento derivado de plaquetas;^{41,42,43} propiedades antiangiogénicas produciendo sustancias como trombospondina-1, endostatina e inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1,2,3 y 4; *tissue inhibitors of metalloproteases*, por sus siglas en inglés);⁴² finalmente se han encontrado ciertas propiedades antimicrobianas como bactricidin, beta-lisina, lisozima, transferrina e inmunoglobulinas.^{45,46}

Además de las propiedades previamente descritas, otra característica extremadamente importante de la membrana amniótica, es la ausencia de la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-A, -B, -C y DR,^{47,48} lo que provee un privilegio inmunológico y evita la necesidad de inmunosupresión sistémica al utilizarla, y también se han encontrado ciertas propiedades inmunosupresoras.⁴⁹

Antecedentes

Las células troncales son células maestras con propiedades importantes a destacar en comparación con otras células. Las características más importantes son las siguientes: capacidad de auto-renovación, prolongada habilidad de proliferación y potencial para diferenciarse a distintas estirpes celulares (Figura 4).^{50,51,52}

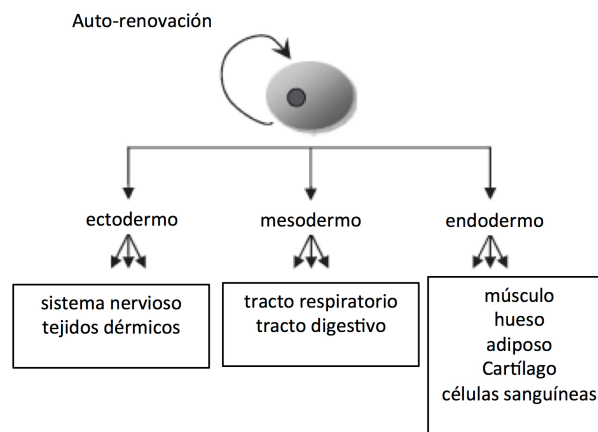


Figura 4: Esquema de las principales características de las células madre/troncales: auto-renovación, proliferación y diferenciación hacia otras estirpes celulares (Modificado: Fortier LA, Vet Surg 2005;34:415-423).

Existen varios orígenes de células madre humanas, tales como: embrionarias, hematopoyéticas, mesenquimales, neurales, provenientes de progenitor endotelial, derivadas de cordón umbilical y pluripotenciales inducidas; siendo de las más controversiales las embrionarias y las pluripotenciales inducidas. Las primeras debido a sus conflictos éticos en su obtención y las inducidas

debido a la posibilidad de generar teratomas y otras tumoraciones malignas.^{53,54,55,56}

Las células troncales mesenquimales por otro lado, se encuentran prácticamente en todos los tejidos humanos, son responsables de regeneración y homeostasis. Fueron descritas desde los años 60 como unidades formadoras de fibroblastos y posteriormente mejor descritas, aisladas y caracterizadas por Friedenstein en 1974.⁵⁷ Las células troncales mesenquimales tienen forma de huso y presentan multipotencialidad, aunque no se ha demostrado su origen se piensa que los pericitos perivasculares están involucrados en su formación.^{58,59,60}

Hay ciertas características importantes para identificar a las células madre mesenquimales, entre ellas: se trata de tejido conectivo embrionario proveniente del mesoderma, son células adheribles en cultivos que expresen distintos marcadores entre ellos CD105 y CD73 y deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* bajo ciertas condiciones establecidas.^{61,62}

Por otro lado, la membrana amniótica es una membrana fetal delgada, traslúcida, semipermeable, elástica, avascular y altamente usada en oftalmología.^{63,64} Tiene células troncales mesenquimales con capacidad de diferenciación además de propiedades inmunosupresoras. Sin embargo, las células obtenidas de membrana amniótica contienen aún cierto grado muy aceptable potencialidad (Figura 5), sin consideraciones éticas al tratarse de un desecho biológico, además de carecer de inmunogeneidad.⁵³ Todas estas

propiedades y características, hacen a la membrana amniótica proveedora potencial de células troncales mesenquimales para su posible uso en medicina regenerativa.^{65,66,67}

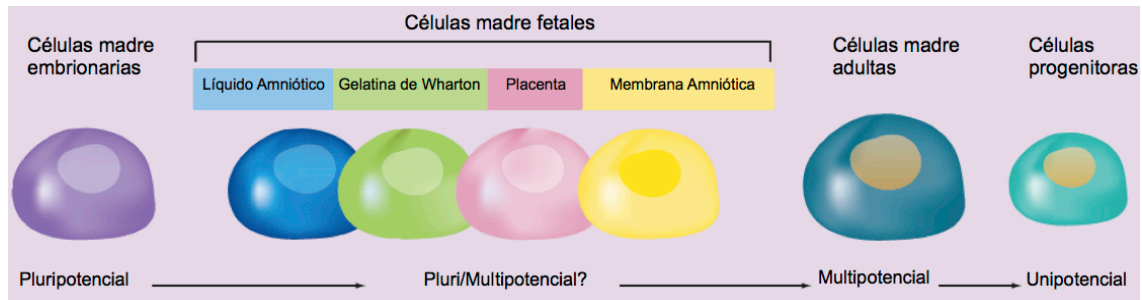


Figura 5: Representación de la potencialidad con base a la etapa del desarrollo (Modificado: Pappa KI, Anagnou MP, Regen Med 2009;4:423-433).

Dentro de las propiedades de la córnea, se trata de un tejido avascular y transparente. Recientemente se ha mostrado que las células madre corneales se encuentran distribuidas en toda la superficie corneal y no exclusivamente en el limbo esclerocorneal.^{68,69} La deficiencia de células madre queratolímbicas provoca conjuntivalización, vascularización, inflamación crónica y opacificación corneal (Figura 6). Las causas más comunes de ceguera corneal por deficiencia de células madre corneales son quemaduras químicas y térmicas, síndrome de Stevens-Johnson, aniridia, tracoma, penfigoide ocular cicatrizal, secuelas de queratitis infecciosas y trauma, entre otras. Estas enfermedades corneales son de las más complejas y difíciles de tratar, y los tratamientos actuales son complejos y habitualmente poco exitosos.^{70,71,72}

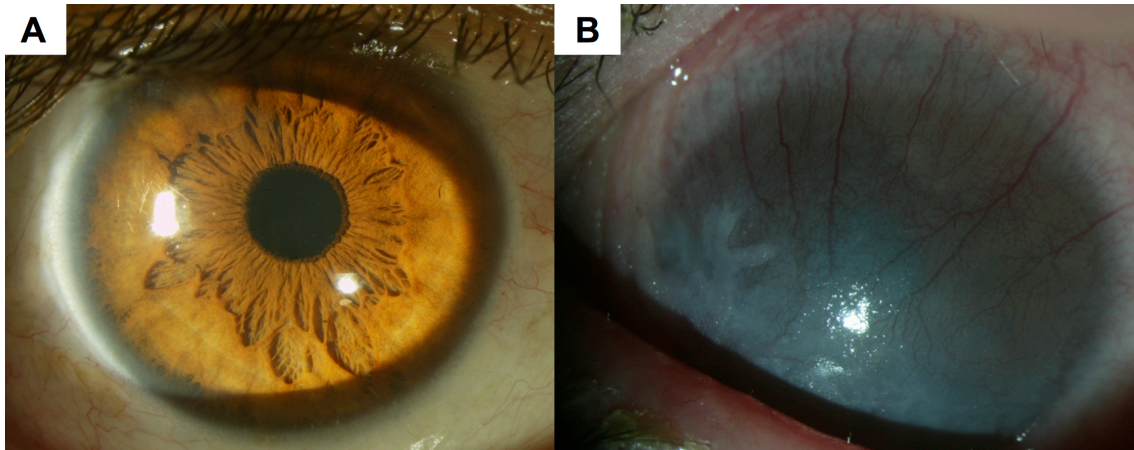


Figura 6: Fotografía clínica de un paciente con córnea clara, transparente, sin opacidades, clínicamente sana (A), comparada con paciente con deficiencia de células troncales corneales con vascularización, conjuntivalización y opacidad corneal generalizada (B).

Con base en lo anterior, realizamos distintos estudios con células madre mesenquimales de membrana amniótica humana (hAM-MSCs) en modelos de daño corneal, debido a que las células troncales muestran adhesión, expansión y diferenciación; además que la membrana amniótica es ampliamente usada en afecciones oftalmológicas. La combinación de estudios experimentales y su posible aplicación en pacientes mediante ingeniería tisular (investigación traslacional) podría beneficiar a pacientes con deficiencia de células queratolímbicas en el futuro.

Justificación

La deficiencia de células queratolímbicas es de las principales causas de ceguera corneal. Las principales patologías que generan deficiencia de células queratolímbicas son: quemaduras químicas y térmicas, síndrome de Stevens-

Johnson, penfigoide ocular cicatrizal, secuelas de queratitis infecciosa, aniridia, secuelas de trauma, entre otras. Las enfermedades corneales, por deficiencia de células queratolímbicas severas, son las entidades más complejas de tratar y actualmente existen tratamientos poco exitosos. Las células troncales mesenquimales de membrana amniótica humana muestran adhesión celular, expansión y diferenciación *in vitro*. La membrana amniótica es un sustrato ideal para el desarrollo de tejido corneal, debido a que se ha empleado con éxito en distintos procedimientos en oftalmología. La combinación de estudios *in vitro* y su posible aplicación podría beneficiar a pacientes con deficiencia de células queratolímbicas.

Planteamiento del Problema

La deficiencia de células queratolímbicas resulta en conjuntivalización, neovascularización, inflamación crónica y subsecuente opacificación corneal. Se han utilizado a las células troncales del mesenquima de la membrana amniótica para diferenciarlas en diferentes estirpes celulares como células beta-pancreáticas, hepatocitos, cardiomiocitos, adipocitos, osteoblastos y neuronas.

La aplicación de células madre mesenquimales provenientes de membrana amniótica podría tener una importante actividad en la reparación y regeneración corneal.

Hipótesis

La aplicación de células troncales mesenquimales obtenidas de membrana amniótica, en modelos de daño corneal tendrán un efecto de mejoría en la reparación corneal.

Objetivos Generales

Establecer la metodología para la aplicación células troncales mesenquimales derivadas de membrana amniótica humana y determinar su eficacia como alternativa terapéutica en modelos de lesión corneal

La meta principal es la generación y análisis de nuevos mecanismos en la regeneración del tejido corneal, principalmente para su uso como terapéutica en afecciones corneales y oftalmología general.

Además, con los resultados obtenidos de este proyecto de investigación se propondrán distintas herramientas para la medicina regenerativa utilizando las células troncales del mesénquima de la membrana amniótica para uso potencial en otros tejidos.

Diseño y tipo de estudio

Se trata de un estudio experimental de investigación médica básica en un modelos animales. Se realizaron estudios celulares, bioquímicos, fisiológicos y análisis de propiedades de terapia celular.

Se realizaron estudios celulares, fisiológicos, bioquímicos y análisis de propiedades de terapia celular.

Metodología

- Obtención de las células troncales del mesénquima de la membrana amniótica; se obtuvieron placentas de cesáreas a término (38-40 semanas de gestación), sin trabajo de parto. Se separó el corión del amnios mediante disección roma, el corión se desechó, mientras que el amnios se desepitelizó utilizando dispasa-II (1.4 UI/ml) durante 30 min a 37°C. El amnios desepitelizado se incubó con colagenasa-II (0.75 mg/ml) durante 90 min a 37°C. Se centrifugó la suspensión celular a 800 g x 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió con DMEM/F12 (v/v) suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor (medio de cultivo). Se cuantificó la viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripano en un hemocitómetro, se aceptó iniciar el cultivo con 90% de células viables. Las células se cultivaron en medio de cultivo en botellas de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Se esperó 72 h para que se adhirieran las células mesenquimales, se retiró el sobrenadante con las células no adherentes. Se observaron al microscopio invertido para identificar la morfología fibroblástica. Se utilizaron las células en los primeros 4-6 pases.

- Caracterización fenotípica de las células troncales del mesénquima de la membrana amniótica, se caracterizaron las células invariablemente en el pase 4. Para la caracterización se realizó reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) y citometría de flujo. Para la realización de la RT-PCR se obtuvo el RNA total mediante la técnica de trizol, se analizó la concentración y la pureza del RNA, se utilizó 1 ug de RNA total para la retrotranscripción utilizando oligo-dT y Omniscript II, que se llevó a cabo a 37°C durante 1 h. Se realizaron las amplificaciones por PCR utilizando primers específicos mediante un termociclador. Para la técnica de citometría de flujo, las células se obtuvieron mediante tripsina 0.025% en PBS-EDTA durante 5 min, se detuvo la reacción mediante PBS-SFB 10%. Se lavaron las células con PBS, albúmina sérica bovina al 0.1% y azida de sodio al 1%, se incubaron con los siguientes anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos: anti-CD29, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD117, anti-HLA-ABC y HLA-DR; se lavó el exceso de anticuerpos y se adquirieron en un citómetro de flujo de 4 canales. Se analizaron mediante histogramas y gráficas de puntos.

- Diferenciación in vitro de las troncales del mesénquima de la membrana amniótica en células no epiteliales: Una de las principales características que

poseen las células troncales es el potencial para diferenciarse en otras estirpes celulares *in vitro*, para ello se diferenciaron hacia neuronas usando DMEM-H 10% SFB 30 $\mu\text{mol/L}$ ácido transretinoico. Se transdiferenciaron en condrocitos con DMEM-H, 10% SFB, 1 $\mu\text{mol/L}$ de insulina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de TGF-beta1 y 300 nmol/L de ácido ascórbico. Todos los ensayos de transdiferenciación se realizaron hasta por 3 semanas. Posterior a la transdiferenciación, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. Las células se incubaron en cubreobjetos cargados con poly-L-lisina, se fijarán con paraformaldehído al 4% por 20 min a 4°C y se lavarán con PBS. Las células se permeabilizaron usando PBS con triton 100X al 0.01% por 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron con anticuerpos primarios: anti-nestina y anti-colágena tipo II. Todos estos anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo universal biotinado durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se revelaron utilizando diaminobenzidina por 1-3 min, se observaron al microscopio de fluorescencia.

- Desarrollo de un modelo murino de deficiencia de células limbales: El modelo experimental se llevó a cabo en ratones BALB/c o C57BL/6 adultos de 6-8 semanas y conejos Nueva Zelanda de entre 2.5 y 3.5 Kg. Se anestesiaron mediante ketamina (50 mg/Kg) y xylazina (5 mg/Kg) via intraperitoneal o fentobarbital intravenoso al 2%. Adicionalmente recibieron una gota de tetracaína para anestesiarse la córnea de forma tópica. Se realizó una quemadura mediante el uso de un anillo de filtro con un diámetro de 3 mm para ratones y de 8 mm para conejos, previamente saturado con NaOH a 0.5 mol/L o etanol absoluto; este anillo se colocó en el limbo esclero-corneal durante 20

segundos; seguido a la quemadura se irrigó exhaustivamente el ojo con solución salina balanceada. Se instilaron gotas de antibióticos de manera tópica tres veces al día durante 5 días posterior a la quemadura. Los cambios en la cámara anterior al igual que en la córnea se realizaron mediante lámpara de hendidura. Se evaluó la superficie corneal de acuerdo a la extensión del defecto epitelial, opacidad y neovascularización. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con los lineamientos de ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) y se contó con la aprobación del Comité de Ética respectivo.

- Aplicación intracameral de células troncales mesenquimales de membrana amniótica: En todos los ensayos se realizaron placebos quirúrgicos (“*sham*”) con aplicación de solución salina balanceada (BSS) inmediatamente después de la quemadura química. Se realizaron aplicaciones intracamerales (en la cámara anterior) con una incisión superior y mediante microjeringas de Hamilton aplicando una suspensión de 3 microlitros de células troncales mesenquimales de membrana amniótica (1×10^5 hAM-MSCs) en ratones y 100 microlitros con al menos 1×10^6 hAM-MSCs.

Resultados

Se obtuvieron células mesenquimales a partir de membrana amniótica, las células mostraron características fenotípicas similares a fibroblastos (Figura 7).

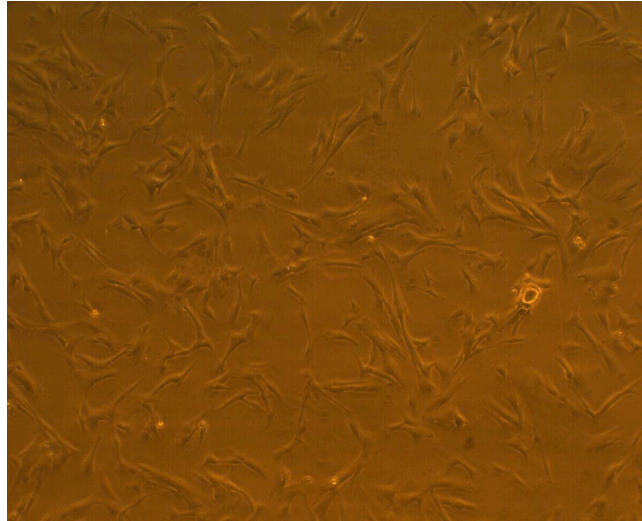


Figura 7: Células madre o troncales mesenquimales provenientes de membrana amniótica humana, fenotípicamente muestran forma de huso.

Se lograron caracterizar mediante citometría de flujo con propiedades de células troncales mesenquimales, se tipificaron con positividad a CD105, CD29 y CD 73, así como negatividad para CD34, CD45 y CD44 (Figura 8).

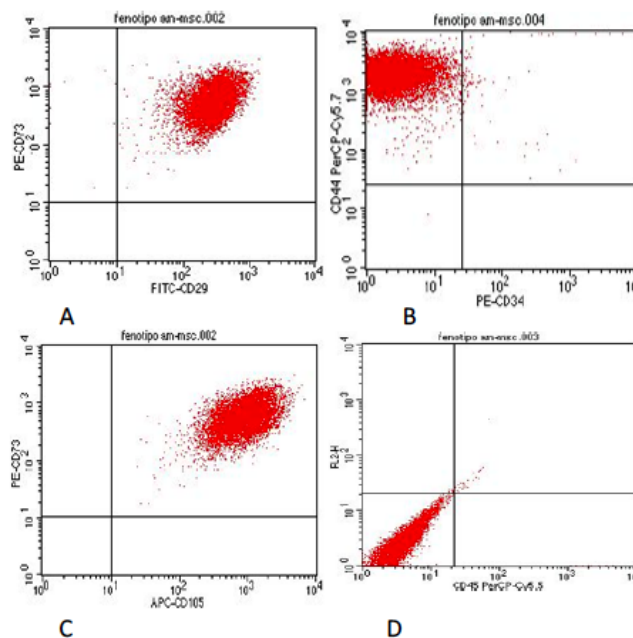


Figura 8: Gráficas de punto de citometría de flujo demostrando la caracterización de las células troncales mesenquimales, con positividad para CD105, CD29 y CD73, así como negatividad para CD34, CD45 y CD44.

En los ensayos de transdiferenciación, se demostró la diferenciación de las células hacia distintas estirpes celulares. Mediante insulina se logró diferenciación hacia condrocitos con marcadores positivos para colágeno-II, además de lograr diferenciación hacia neuronas mediante ácido transretinoico, con positividad a los marcadores de nestina (Figura 9).

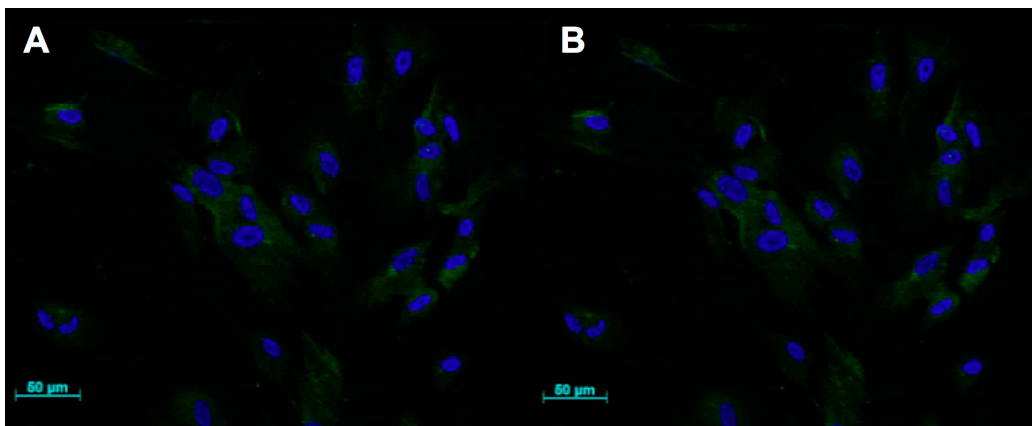


Figura 9: Ensayos de transdiferenciación de hAM-MSCs mostrando positividad para marcadores de colágeno-II (estímulo insulina, diferenciación condrocitos) (A), y positividad para marcadores de nestina (estímulo ácido transretinoico, diferenciación neuronas) (B).

Se desarrolló un modelo de quemadura consistente y repetible con generación de deficiencia de células madre queratolímbicas severa en caso de no recibir tratamiento (Figura 10). Se crearon distintos estímulos de lesión siendo el más grave el inducido por NaOH y más moderado el generado por alcohol 99.6%.

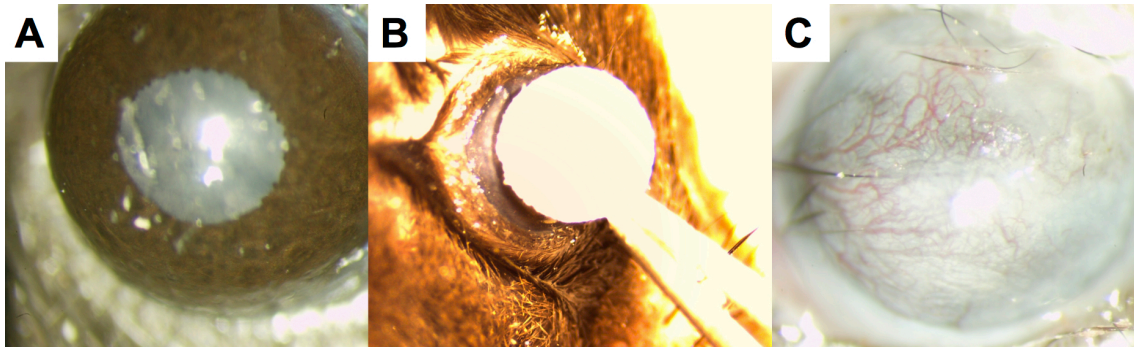


Figura 10: Fotografía clínica de modelo murino C57BL/6 mostrando córnea sana sin lesión (A), posterior aplicación de NaOH con papel filtro de 3mm (B), sin tratamiento se desarrolla deficiencia de células queratolímbicas importante con vascularización, opacidad y pérdida de la función (C).

La aplicación dentro de la cámara anterior de las células madre mesenquimales se logró tanto en ratones como en conejos (Figura 11).

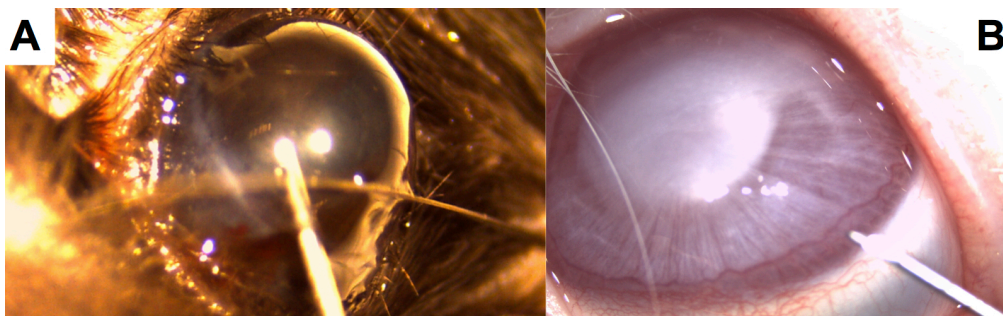


Figura 11: Inyección intracameral en las distintas especies animales, inmediatamente después de la lesión corneal. Se muestra tanto modelo murino (A) como modelo en conejos (B).

Los xenotrasplantes o xenoinjertos de células madre mesenquimales provenientes de membrana amniótica, mostraron mejoría significativa en la transparencia corneal así como notable mejoría clínica en la respuesta del infiltrado inflamatorio (Figura 12,13).

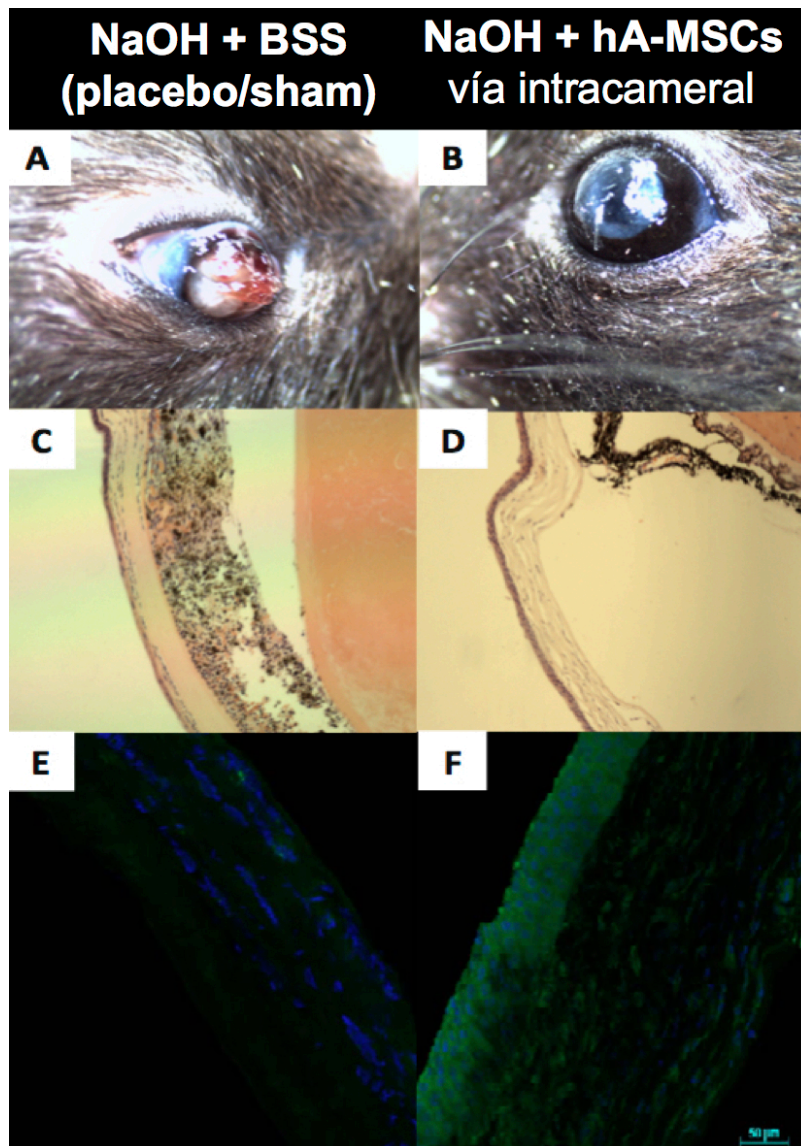


Figura 12: NaOH = cloruro de sodio 0.5N; BSS = solución salina balanceada; hA-MSCs = células troncales mesenquimales de membrana amniótica humana. Modelo murino C57BL/6 con severa vascularización corneal, opacificación e inflamación (A), se muestra una notable mejoría clínica en el grupo tratado con hAM-MSCs (B). Además se presentó un infiltrado inflamatorio abundante en el grupo de BSS (C) comparado con una reacción más moderada en el grupo tratado con hAM-MSCs (D). hAM-MSCs marcadas con fluoresceína se presentan bajo el microscopio de fluorescencia (E,F) [contra-tinción de núcleos con DAPI].

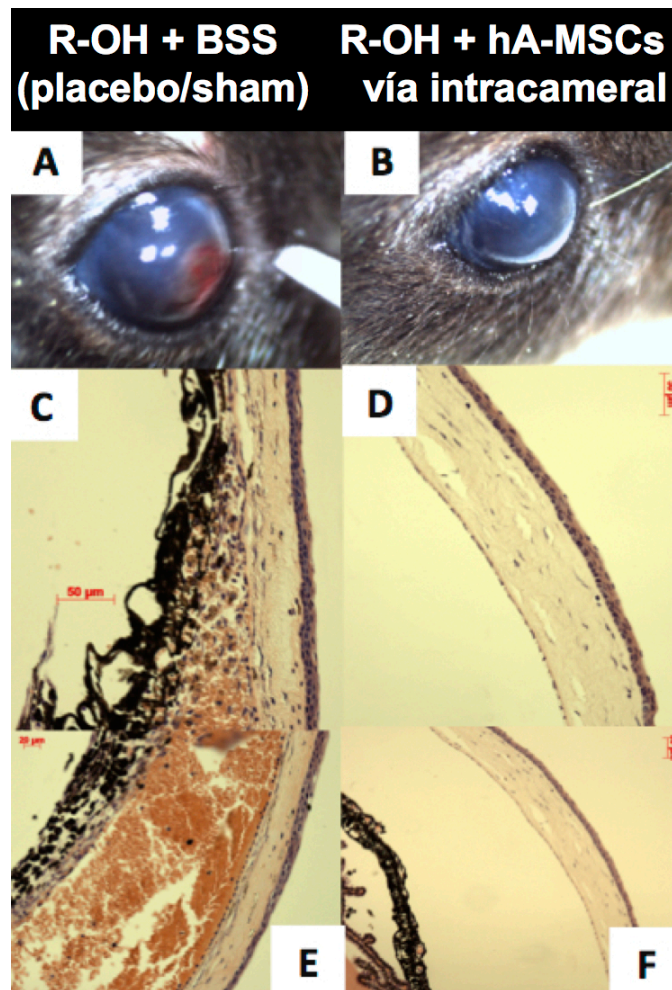
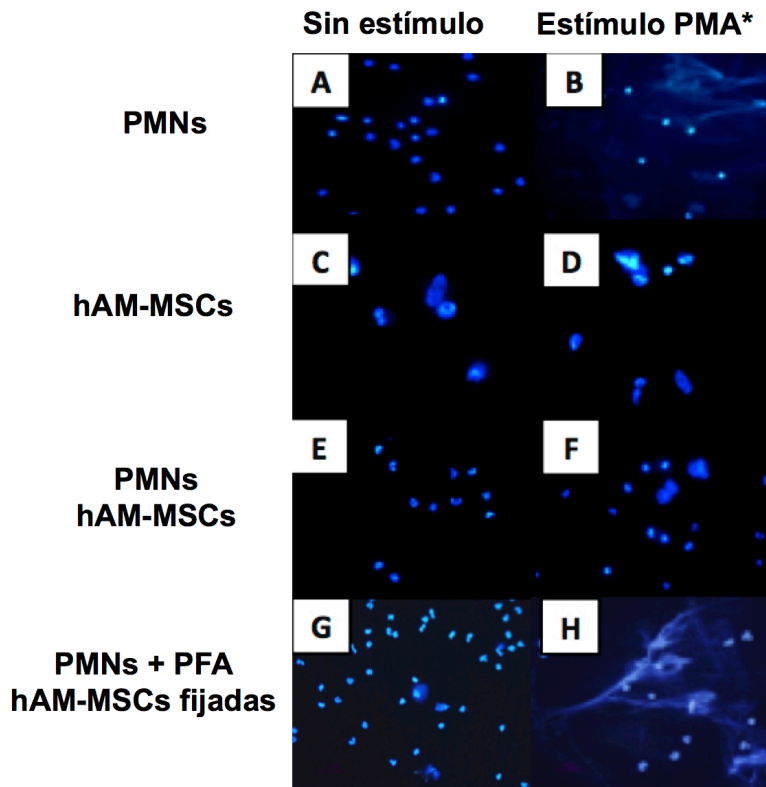


Figura 13: R-OH = 99.6% alcohol; BSS = solución salina balanceada; hA-MSCs = células troncales mesenquimales de membrana amniótica humana. En general fueron lesiones menos severas con alcohol absoluto. Se encontró más vascularización y opacificación corneal en el grupo BSS (A) comparado con el grupo tratado con hAM-MSCs (B). Estudios histológicos de hematoxilina-eosina mostraron mayor inflamación e infiltración celular en el grupo BSS (C,E) comparado con el grupo tratado con hAM-MSCs intracameral (D,F).

En otros ensayos se encontró que la interacción de células polimorfonucleares de sangre periférica con el sobrenadate de las células mesenquimales de membrana amniótica mostraba una importante disminución de trampas formadoras de neutrófilos (NET's) (Figura 14).



***PMA = acetato de forbol miristato
PMNs = neutrófilos polimorfonucleares; hAM-MSCs
= células mesenquimales humanas de membrana
amniótica; PFA = paraformaldehído**

Figura 14: Ensayos de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) mostrando la capacidad de las células mesenquimales hAM-MCs de inhibir la formación de trampas.

Se realizaron los estudios en conejos encontrando hallazgos clínicos similares, además de inhibición importante histológica del edema, infiltrado inflamatorio en el grupo tratado con hAM-MSCs. Se demostró también mediante inmunofluorescencia, menor diferenciación hacia miofibroblastos debido a menor expresión de α SMA (smooth muscle actin) en el grupo tratado con células mesenquimales humanas de membrana amniótica. Se demostró además el aumento de grosor corneal central y mayor edema en el grupo de quemadura corneal sin hAM-MSCs en comparación con el grupo tratado con hAM-MSCs y en grupo control (Figura 15).

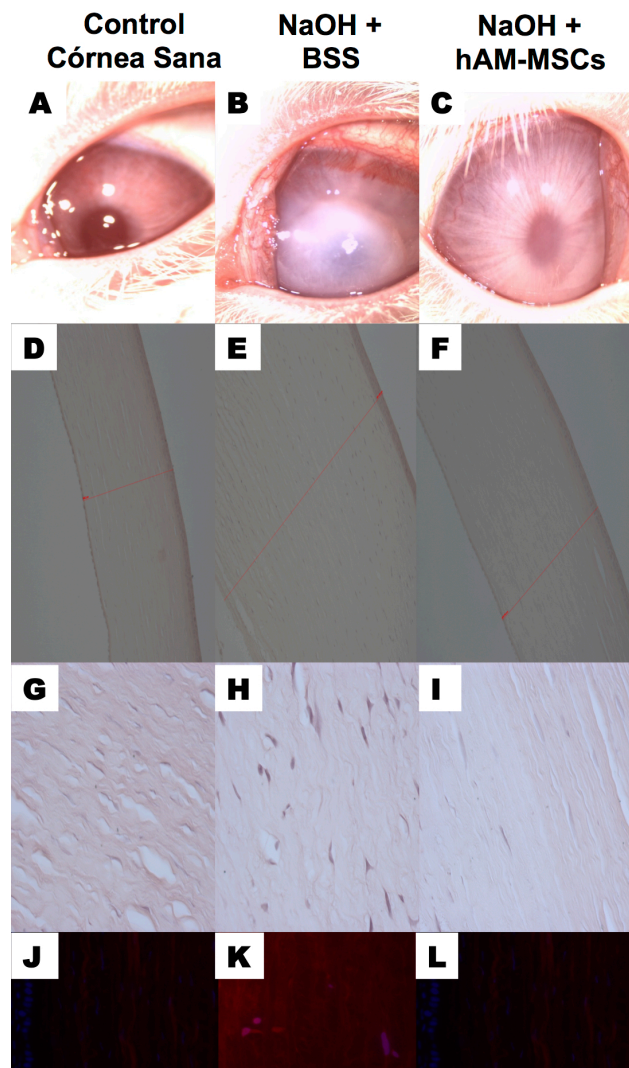
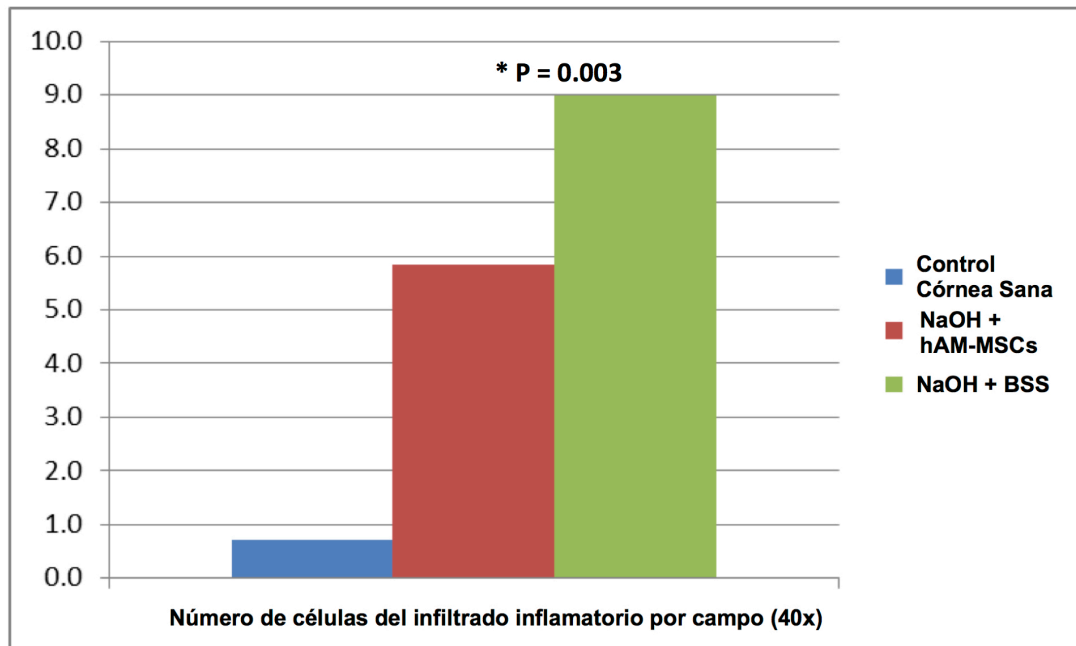


Figura 15: NaOH = cloruro de sodio 0.5N; BSS = solución salina balanceada; hA-MSCs = células troncales mesenquimales de membrana amniótica humana. Modelo en conejos Nueva Zelanda sin vascularización, córnea transparente (A) con BSS se desarrolla vascularización corneal, opacificación e inflamación (B), se muestra una notable mejoría clínica en el grupo tratado con hAM-MSCs (C). Se aprecia en corte histológico grosor corneal normal (D), edema corneal importante con aumento de grosor en el grupo de BSS (E), y notable mejoría del edema corneal en el grupo tratado con células mesenquimales (F). Ausencia de inflamación estromal en el grupo control (G), se muestra infiltrado inflamatorio abundante y fibrosis en el grupo de BSS (H) comparado con una reacción más moderada en el grupo tratado con hAM-MSCs (I). Ausencia de miofibroblastos (marcadores para α -SMA, smooth muscle actin, rojo) en córneas sanas (J), presencia importante de diferenciación hacia miofibroblastos en estroma del grupo BSS (K) en el grupo tratado con hAM-MSCs notable disminución y prácticamente ausencia de α -SMA (L), bajo el microscopio de fluorescencia [contra-tinción de núcleos con DAPI].

Finalmente, se realizaron conteos celulares del infiltrado inflamatorio por campo 40x, encontrando menor número de células inflamatorias en el grupo tratado con hAM-MSCs en comparación del grupo no tratado con un valor de $P=0.003$ siendo estadísticamente significativo. (Figura 16).



Discusión

Dentro de los resultados obtenidos, se demostró la obtención y diferenciación de células madre mesenquimales a partir de membrana amniótica. Diversos estudios han reportado el potencial de reparación e incluso migración de las células troncales de membrana amniótica. Se han realizado modelos animales de infarto agudo al miocardio, que al aplicar células mesenquimales humanas de membrana amniótica, el tejido lesionado adquiere características fenotípicas

de cardiomiocitos y además adquieren contractilidad registrada en estudios electrofisiológicos.⁷³ Otro modelo murino induciendo cirrosis hepática mediante tetracloruro de carbono y al aplicar a distancia, directamente en el bazo, las células troncales mesenquimales humanas de membrana amniótica, demuestran un efecto reparador y de migración importante.⁷⁴

El tejido perivascular aparenta ser el origen de las células madre mesenquimales, los criterios de caracterización se modifican conforme aparecen nuevos marcadores más específicos. La heterogeneidad, localización y alta función en la homeostasis de las células mesenquimales persisten siendo totalmente entendidas. El conocimiento sobre el funcionamiento de las células mesenquimales se ha expandido, se han reportado y encontrado propiedades antifibróticas, antiinflamatorias, retraso en la apoptosis, y fomento de la mitosis o de un entorno regenerativo.^{75,76,77,78}

Particularmente en tejido corneal, se han encontrado funciones de células mesenquimales que promueven la transdiferenciación a células epiteliales, modulan el efecto inflamatorio y angiogénico, favorecen a reparación corneal y poseen efecto inmunomodulador.⁷⁹ Se han realizado algunos estudios con células troncales mesenquimales posterior a daño corneal, el modelo se realizó en ratas Lewis generando lesiones mecánicas corneales, posteriormente se aplicaron células mesenquimales humanas provenientes de médula ósea por vía intravenosa y tópica. Los autores encontraron notable mejoría clínica, disminución de los infiltrados de neutrófilos y mayor expresión de una potente proteína antiinflamatoria TSG-6 (TNF- α stimulated gene/protein 6).⁸⁰

En otro estudio, se realizaron quemaduras corneales con hidróxido de sodio en conejos albinos, se inyectaron células madre mesenquimales humanas de membrana amniótica, además de un injerto de membrana amniótica, el estudio demostró una mejoría en la reparación epitelial, menor opacidad y neovascularización en el grupo tratado.⁸¹

En nuestros estudios además de demostrar la mejoría en la respuesta clínica al emplear hAM-MSCs, se demostró la disminución de la respuesta inflamatorio mediante la inhibición de la formación de trampas de neutrófilos y una menor respuesta hacia la transdiferenciación a miofibroblastos en el estroma corneal, al disminuir notablemente la expresión de α -SMA (*smooth muscle actin*, por sus siglas en inglés). Existen varias propuestas acerca de los mecanismos de acción de las células madre mesenquimales, se propone un reemplazo celular directo, otro mecanismo posible es la mejoría (*empowerment*) célula a célula, algunos experimentos apoyan que el sobrenadante y los factores solubles podrían contribuir en la reparación. Es importante destacar que las células mesenquimales responden al daño o lesión y el poder de regeneración aparenta ser despertado por las lesiones.^{75,82,83}

Recientemente se han descrito células troncales mesenquimales dentro del estroma corneal, sin embargo aparentan estar en un estado quiescente ya que carecen de una diferenciación terminal.⁸⁴ Estos hallazgos abren una línea de investigación importante para la posible obtención de células madre

mesenquimales a partir del propio tejido corneal con un potencial privilegio inmunológico.

El cambio en paradigmas sobre la localización de las células troncales queratolímbicas generado por estudios que sugieren que la distribución de las células madre se encuentra en toda la superficie corneal,⁶⁸ y las técnicas novedosas de trasplante simple de células epiteliales límbicas distribuidas en la mayoría del área corneal,^{29,30} aportan nuevas preguntas respecto a la distribución, proliferación y migración de las células madre a través del tejido corneal.

Los tratamientos con células mesenquimales tienen una dualidad teniendo un potencial dañino, se debe evaluar a fondo la pluripotencialidad a expensas de tumorigenicidad. La combinación a futuro con bioingeniería aparenta tener un panorama promisorio. La córnea y los tejidos oculares son partes más accesibles que otros tejidos del organismo para su estudio.⁸⁵ Se debe tener cautela y evaluar el balance de la capacidad regeneradora de las células, así como los daños o efectos adversos potenciales, tales como rechazo inmunológico, pérdida de la función y transformación neoplásica. Es importante conservar un apego ético, así como vigilar y regular las fuentes de donación. A pesar de que las terapias con células madre no serán la panacea, serán herramientas útiles para médicos y pacientes. Las terapias regenerativas basadas en células madre serán una realidad en oftalmología y otras ramas de la medicina.⁸⁶

Conclusiones

Los datos y resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que las células madre mesenquimales provenientes de membrana amniótica humana, podrían ser aplicadas en tratamientos regenerativos corneales, y se encontraron propiedades inmunosupresoras que podrían ser útiles en enfermedades oculares inflamatorias. Los tratamientos de reparación corneal y ocular basados en terapias celulares incluyendo células madre mesenquimales son un área de oportunidad para pacientes con daño severo secundario a enfermedades o traumas. A pesar de que existen varios obstáculos para tratamientos basados en células troncales, existe un futuro promisorio en la medicina regenerativa.

Referencias

1. Rapuano CJ, Fishbaugh JA, Strike DJ. Nine point corneal thickness measurements and keratometry readings in normal corneas using ultrasound pachymetry. *Insight* 1993;18:16-22.
2. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
3. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to

- proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201-209.
4. Pellegrini G, Rama P, Mavilio F, De Luca M. Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *J Pathol* 2009;217:217-228.
 5. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-1443.
 6. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81:247-264.
 7. Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, Tano Y, Nishida K. N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007;25:289-296.
 8. Hayashi R, Yamato M, Saito T, Oshima T, Okano T, Tano Y, Nishida K. Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin alpha6 and CD71. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:256-263.
 9. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 2004;565:6-10.
 10. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89:529-532.
 11. Shanmuganathan VA, Foster T, Kulkarni BB, Hopkinson A, Gray T, Powe DG, Lowe J, Dua HS. Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br J Ophthalmol* 2007;91:514-519.

12. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982;80:155-71.
13. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003;22:S28-S34.
14. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-722.
15. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1301-1314.
16. Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000;84:273-278.
17. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-1703.
18. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet* 2012;379:1749-1761.
19. Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS. Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology* 2002;109:862-868.
20. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1278-1284.
21. Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000;107:1518-1523.
22. Gomes JA, Santos MS, Ventura AS, Donato WB, Cunha MC, Höfling-Lima AL. Amniotic membrane with living related corneal limbal/conjunctival allograft

for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1369-1374.

23. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.

24. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am* 1999;280:86-89.

25. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.

26. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-1574.

27. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;351:1187-1196.

28. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1280-1284.

29. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2012;96:931-934.

30. Amescua G, Atallah M, Nikpoor N, Galor A, Perez VL. Modified simple limbal epithelial transplantation using cryopreserved amniotic membrane for unilateral limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2014;158:469-475.

31. Hernández-Bogantes E, Amescua G, Navas A, Garfias Y, Ramirez-Miranda

A, Lichtinger A, Graue-Hernández EO. Minor ipsilateral simple limbal epithelial transplantation (mini-SLET) for pterygium treatment. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1598-1600.

32. Vazirani J, Ali MH, Sharma N, Gupta N, Mittal V, Atallah M, Amescua G, Chowdhury T, Abdala-Figuerola A, Ramirez-Miranda A, Navas A, Graue-Hernández EO, Chodosh J. Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: multicentre results. *Br J Ophthalmol* 2016;[En prensa].

33. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999;18:73-79.

34. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338-1345.

35. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 2007;75:91-96.

36. Chávez-García C, Jiménez-Corona A, Graue-Hernández EO, Zaga-Clavellina V, García-Mejía M, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y. Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell Tissue Bank* 2016;17:261-268.

37. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant* 2014;4:111-121.

38. Baum J. Thygeson lecture. Amniotic membrane transplantation: why is it

effective? *Cornea* 2002;21:339-341.

39. Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:878-886.

40. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 1992;150:243-255.

41. Boudreau N, Simpson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-893.

42. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-449.

43. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-413.

44. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348-352.

45. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991;12:285-288.

46. Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:224-229.

47. Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fensom AH, Tansley L, Connolly P, Hsi BL,

Faulk WP, Travers P, Bodmer WF. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982;295:325-327.

48. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981;2:1003-1005.

49. Garfias Y, Zaga-Clavellina V, Vadillo-Ortega F, Osorio M, Jimenez-Martinez MC. Study of the expression of CD30 in pterygia compared to healthy conjunctivas. *Mol Vis* 2009;15:2068-2073.

50. De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, Hochedlinger K, Jaenisch R, Lee S, Leitch HG, Lensch MW, Lujan E, Pei D, Rossant J, Wernig M, Park PJ, Daley GQ. Hallmarks of pluripotency. *Nature* 2015;525:469-478.

51. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005;34:415-423.

52. Dorn DC, Dorn A. Stem cell autotomy and niche interaction in different systems. *World J Stem Cells* 2015;7:922-944.

53. Gokhale PJ, Andrews PW. The development of pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:403-408.

54. Li F, Zhao SZ. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J Stem Cells* 2014;6:296-304.

55. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med* 2009;4:423-433.

56. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 2008;58:33-42.

57. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974;17:331-340.
58. Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. Stem Cells Cloning 2015;8:125-134.
59. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2011;12:126-131.
60. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N, Reppel L, He Y. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. Stem Cells Int 2015;2015:734731.
61. Penny J, Harris P, Shakesheff KM, Mobasher A. The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. Front Biosci (Landmark Ed) 2012;17:892-908.
62. Spencer ND, Gimble JM, Lopez MJ. Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. Vet Surg 2011;40:129-139.
63. Kenyon KR. Amniotic membrane: mother's own remedy for ocular surface disease. Cornea 2005;24:639-642.
64. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005;16:233-240.
65. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Cicione C, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Human amniotic

membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* 2011;81:162-171.

66. Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning* 2014;7:53-63.

67. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, Moraleda JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25:91-98.

68. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008;456:250-254.

69. Sun TT, Tseng SC, Lavker RM. Location of corneal epithelial stem cells. *Nature* 2010;463:E10-11.

70. Holland EJ. Management of Limbal Stem Cell Deficiency: A Historical Perspective, Past, Present, and Future. *Cornea* 2015;34:S9-S15.

71. Osei-Bempong C, Figueiredo FC, Lako M. The limbal epithelium of the eye-- a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays* 2013;35:211-219.

72. Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM. A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans. *Am J Ophthalmol* 2008;146:251-259.

73. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically

tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res* 2010;106:1613-1623.

74. Zhang D, Jiang M, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS One* 2011;6:e16789.

75. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bernardo ME, Biagi E, Brini AT, D'Amico G, Fagioli F, Ferrero I, Locatelli F, Maccario R, Marazzi M, Parolini O, Pessina A, Torre ML, Italian Mesenchymal Stem Cell Group. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des* 2013;19:2459-2473.

76. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009;106:984-991.

77. Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, van Griensven M, Gabriel C. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev* 2011;20:2115-2126.

78. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, Shi Y. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:51-58.

79. Yao L, Bai H. Review: mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Mol Vis* 2013;19:2237-2243.

80. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, Rosa RH Jr, Prockop DJ. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea

without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein

6. *Stem Cells* 2011;29:1572-1579.

81. Zeng W, Li Y, Zeng G, Yang B, Zhu Y. Transplantation with cultured stem cells derived from the human amniotic membrane for corneal alkali burns: an experimental study. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:73-81.

82. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014;15:1009-1016.

83. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9:11-15.

84. Pinnamaneni N, Funderburgh JL. Concise review: Stem cells in the corneal stroma. *Stem Cells* 2012;30:1059-1063.

85. Harkin DG, Foyn L, Bray LJ, Sutherland AJ, Li FJ, Cronin BG. Concise reviews: can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells* 2015;33:785-791.

86. Jeganathan VS, Palanisamy M. Treatment viability of stem cells in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21:213-217.