



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD**

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA "CONDE DE VALENCIANA"

**Análisis de los resultados a corto plazo del trasplante
allogénico de células troncales expandidas *in vitro* con
fenotipo ABCB5+/p63+ en pacientes con deficiencia
bilateral de células de limbo**

Tesis que para optar el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Méd. Cir. Esp. Oftalmología Juan Carlos Serna Ojeda

Tutor:

Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA "CONDE DE VALENCIANA"

Comité tutor:

Dr. Alejandro Navas

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA "CONDE DE VALENCIANA"

Dr. Higinio Arzate

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Febrero 2017.



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.

Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra y la Bióloga Experimental Mariana Angélica García Mejía en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en la Unidad Periférica de la Facultad de Medicina Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana en el área de Biología Celular y Tisular de la Unidad de Investigación y el Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva. Esta tesis fue apoyada por los fondos CONACYT-PROBLEMAS NACIONALES 2015-311, CONACYT-CIENCIA BÁSICA 167438, DGAPA UNAM-PAPIIT IN215617, CVU 668682 y la Fundación Conde de Valenciana.

DEDICATORIA

A mis padres, Juan y María del Carmen, por siempre apoyarme en mis sueños, por nunca decirme que no cuando de mejorar se trata, por educarme como una persona de bien, inculcarme valores y darme lo que necesité siempre para formar mi camino y llegar a donde estoy ahora.

A mis hermanas, Claudia, Xóchitl y Gabriela, por ser mis compañeras de vida, por apoyarme en todo momento, en lo sentimental y lo profesional, por siempre estar para mí.

A mis pacientes, quienes depositaron su confianza y esperanzas en mí, cada uno de ellos con una historia distinta, todos buscando lo mismo: salud. Al final, todo esto es por ellos, seguiremos avanzando en la ciencia, siempre buscando mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes.

A mis compañeros residentes de Oftalmología y de Córnea y Cirugía Refractiva, por ser mis colegas, y sobre todo a los que se convirtieron también en mis amigos, por las enseñanzas que me han impartido, y por los momentos difíciles que con ellos se hicieron fáciles de llevar.

AGRADECIMIENTOS

A Yonathan Garfias, por ser más que un tutor, un amigo, por impulsarme a lograr mis metas, por siempre estar disponible para mí, por presionarme cuando lo requería, y apoyarme con todo sentido. Por hacerme pasar de médico a convertirme en científico.

A Mariana García, por enseñarme un poco de lo mucho que sabe, por instruirme en lo complicado y en ocasiones frustrante, pero a la vez emocionante y estimulante de la investigación básica.

A mis maestros de Córnea y Cirugía Refractiva, en especial a Enrique Graue, Alejandro Navas y Arturo Ramírez. Por enseñarme a diagnosticar y operar, pero sobre todo enseñarme a tratar a mis pacientes con empatía y dedicación.

A todos aquellos que aportaron y que hicieron que este trabajo mejorara cada vez más, hasta tener el resultado final que se refleja en esta tesis.

Al Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, por permitirme formarme como especialista en Oftalmología, sub-especialista en Córnea y Cirugía Refractiva, y ahora Maestro en Ciencias Médicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y con ello a todos los que fueron mis maestros durante estos 2 años, por darme las herramientas para involucrarme en este mundo llamado ciencia.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras

Figura 1: Imágenes del proceso de generación de los injertos en cultivo celular.	21
Figura 2: Imágenes de citología de impresión.	30
Figura 3: Imágenes de microscopía confocal.....	31
Figura 4: Imágenes clínicas representativas preoperatorias de los pacientes.	34
Figura 5. Adherencia celular al tercer día de cultivo celular.	35
Figura 6: Caracterización y crecimiento de células epiteliales limbales expandidas <i>in vitro</i> sobre membrana amniótica des- epitelizada.....	36
Figura 7: Gráficas de puntos por citometría de flujo para caracterización y expresión de marcadores de células expandidas sobre membrana amniótica.	37
Figura 8: Histogramas de expresión de ABCB5 y $\Delta p63$	38
Figura 9: Electroforesis de los productos de amplificación de PCR de ABCB5, $\Delta p63$ y B2, sin expresión en los respectivos controles.....	39
Figura 10: Imágenes representativas de inmunofluorescencia de los marcadores	40
Figura 11: Imágenes comparativas pre y postoperatorias de los pacientes que presentaron mejoría.....	42
Figura 12: Imagen clínica del con lisis corneal severa.	43

Índice de tablas

Tabla 1: Marcadores que se han asociado con las células troncales del limbo.	13
Tabla 2: Anticuerpos primarios para citometría de flujo e inmunofluorescencia.....	21
Tabla 3: Anticuerpos secundarios para citometría de flujo e inmunofluorescencia.....	22
Tabla 4: Secuencias de primers diseñados para ABCB5, $\Delta p63$ y B2 microglobulina.....	23
Tabla 5: Condiciones de la transcripción reversa para cada uno de los RNAs.....	23
Tabla 6: Tinción de los marcadores ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ para inmunofluorescencias.....	25
Tabla 7: Variables del estudio.....	26
Tabla 8: Resultados pre-quirúrgicos del VFQ-25 modificado.	29
Tabla 9: Características pre-quirúrgicas de los pacientes incluidos.	34
Tabla 10: Resultados de RT-PCR para ABCB5 y $\Delta p63$	39

I.	INTRODUCCIÓN.....	9
	1. Superficie ocular, epitelio corneal y deficiencia de células de limbo.	
	2. Cultivo celular.	
	3. Marcadores celulares en las células del limbo.	
	4. ABCB5 como nuevo marcador de troncalidad.	
II.	ANTECEDENTES.....	14
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
IV.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
V.	JUSTIFICACIÓN.....	16
VI.	OBJETIVOS.....	16
	1. Objetivo general.	
	2. Objetivos específicos.	
VII.	ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	17
	1. Diseño del estudio.	
	2. Descripción de variables.	
	3. Criterios.	
	4. Fases del estudio.	
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
	1. Fase I: Reclutamiento / Incorporación al estudio.	
	2. Fase II: Preparación del aloinjerto y análisis del mismo.	
	3. Fase III: Cirugía de trasplante.	
	4. Fase IV: Seguimiento.	

IX.	RESULTADOS.....	29
	1. Estado preoperatorio de los pacientes.	
	2. Crecimiento de células epiteliales de limbo.	
	3. Citometría de flujo.	
	4. RT-PCR.	
	5. Inmunofluorescencia.	
	6. Resultados clínicos de los pacientes.	
X.	DISCUSIÓN.....	44
	1. Estado preoperatorio.	
	2. Citometría de flujo, RT-PCR, inmunohistoquímica.	
	3. Resultados postoperatorios.	
	4. Limitaciones del estudio.	
	5. Sugerencias para futuros proyectos.	
XI.	CONCLUSIONES.....	50
XII.	REFERENCIAS.....	52
XIII.	ANEXOS.....	57
	1. Anexo I.	
	2. Anexo II.	

INTRODUCCIÓN

Superficie ocular, epitelio corneal y deficiencia de células de limbo.

La superficie ocular es una estructura muy compleja, fundamental para la conservación de la visión. Anatómicamente, la superficie ocular está compuesta por la conjuntiva, la córnea y la unión esclerocorneal también llamada limbo. El limbo esclerocorneal es una zona de transición entre los epitelios de la córnea y el de la conjuntiva bulbar. Esta región es muy importante para evitar que el epitelio conjuntival crezca sobre la córnea. El epitelio del limbo contiene un número elevado de células dendríticas maduras e inmaduras, linfocitos T, melanocitos altamente pigmentados y vasos sanguíneos subyacentes, además en el estrato basal contiene las células menos diferenciadas de la córnea (**Dua y Azuara-Blanco 2000**). Estas células son más pequeñas, de aspecto cúbico y tienen más organelos citoplásmicos; se ha propuesto a éstas como las células troncales del epitelio del limbo que, al diferenciarse y migrar de manera centripeta, originan el epitelio corneal. Se han determinado dos estirpes celulares, las células epiteliales troncales del limbo y las células mesenquimales troncales del limbo. Se ha propuesto que las células epiteliales troncales del limbo se encuentran en regiones llamadas criptas epiteliales limbales (**Dua y cols 2005**).

La disminución de las células troncales del limbo del epitelio corneal ocasiona una superficie ocular inestable. La córnea comienza a conjuntivalizarse y vascularizarse, y comienzan a aparecer defectos epiteliales que pueden ocasionar ulceración corneal (**Hatch & Dana 2009; Lim y cols 2009**). Lo anterior, genera pérdida de la visión, debido a la opacidad del estroma corneal subyacente. Las causas comunes de deficiencia de células troncales del limbo son secundarias a diversos padecimientos que incluyen entre otros: quemaduras químicas y térmicas, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide cicatrizal ocular, pénfigo, múltiples cirugías, empleo de fármacos tópicos como antimetabolitos, neoplasias y uso de lentes de contacto (**Erie y cols 1986; Puangsrucharern & Tseng 1995; Schwartz & Holland 1998**). También existen causas congénitas de deficiencia de células troncales del limbo, sin embargo, son menos comunes y se han asociado a padecimientos como: aniridia congénita, displasias ectodérmicas y esclerocórnea (**Secker y Daniels 2008**). La deficiencia de células del limbo al igual que su disfunción, dan como resultado una

pérdida en la reparación normal del epitelio corneal. El resultado de la disfunción de las células troncales del limbo es la conjuntivalización de la córnea, lo que significa que el epitelio conjuntival invade la córnea, acompañándose de crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en toda la superficie corneal. Esto determina pérdida en la transparencia corneal e inminente pérdida de la visión que generalmente ocurre de forma progresiva y en un plazo de tiempo variable de acuerdo a la etiología.

El diagnóstico de la deficiencia de células troncales del limbo es orientado por la historia clínica y la exploración oftalmológica con la presencia de conjuntiva en la córnea y defectos epiteliales persistentes. Este diagnóstico se debe confirmar mediante citología de impresión del centro de la córnea, cuando existe mezcla de células epiteliales y conjuntivales (**Puangsricharern y Tseng 1995**). Asimismo, recientemente, se ha propuesto el uso del microscopio confocal *in vivo* donde las células del epitelio corneal tienen una morfología bien definida y regular, con bordes claros y citoplasma oscuro, mientras que las células de la conjuntiva son claramente diferenciadas por su hiperreflectividad (**Dua y cols 2009**).

El tratamiento de la deficiencia bilateral de células del limbo, sigue siendo complejo, y dentro de las opciones quirúrgicas que se encuentran disponibles están los distintos tipos de queratoprótesis y procedimientos basados en terapia celular, mismos que en ocasiones pueden requerir el uso de líneas celulares como son las células autólogas de la mucosa oral expandidas *in vitro* (**Nakamura y cols 2004; Vazirani y cols 2016**).

Cultivo celular

La posibilidad de hacer crecer *in vitro* a las células epiteliales troncales del limbo manteniendo su estado de pluripotencialidad hacen de ésta una técnica útil para su estudio, así como para su uso en la terapia mediante Medicina Regenerativa. El cultivo y la expansión *in vitro* de las células epiteliales troncales del limbo se ha utilizado para tratar la deficiencia de células de limbo. El primer reporte de la expansión *in vitro* de estas células del que se tiene registro fue en 1997 en el que se describió el crecimiento de células sobre un lente de contacto a partir de una biopsia del limbo del ojo sano hasta que se obtuvo una capa de células epiteliales que fueron trasplantadas en el ojo enfermo contralateral (**Pellegrini y cols 1997**). Después de este reporte, se han utilizado otros sustratos de

crecimiento para estas células como membrana amniótica y fibrina (**Tsai y cols 2000; Rama y cols 2010**). El tratamiento utilizando células autólogas cultivadas en fibrina ha resultado en más de 70% de efectividad según lo reportado en estudios de seguimiento de más de 10 años (**Baylis y cols 2011; Rama y cols 2010**). Sin embargo, el éxito clínico depende no sólo del número de células troncales trasplantadas, sino también de la preparación preoperatoria del sitio donde serán trasplantadas las células troncales, evitando un ambiente hostil *in vivo* (**Pellegrini y cols 2011**).

El trasplante de células troncales del limbo puede ser autólogo o heterólogo, y este último puede ser de paciente vivo o de donador cadavérico. Sólo en aquellos casos que se trate de daño en un solo ojo, el ojo contralateral sano sin deficiencia de células de limbo es candidato a donar para su posible expansión *in vitro* (**Baylis y cols 2011**). Hay evidencias que demuestran que existe una distribución irregular de las células troncales en el limbo, sin embargo se prefiere utilizar las células aisladas del limbo superior e inferior debido a que se ha corroborado que en estas zonas existe mayor número de células troncales y con mayor clonogenicidad (**O'Callaghan y Daniels 2011**). Cuando las células troncales son obtenidas de un donador vivo, se deben identificar referencias anatómicas del limbo como las palizadas de Vogt y realizar la biopsia, así esta técnica asegura la obtención de una proporción rica en holoclonas que garantiza el éxito en la expansión y trasplante de estas células. De la misma forma, para la obtención de células troncales de un donador cadavérico se debe tener en cuenta el tiempo de procuración del tejido y el tiempo de conservación en el banco de córneas (**Shortt y cols 2010**). Se propone que 24 horas es el tiempo máximo para conservar una biopsia del ojo contralateral (en el caso de autotrasplante), mientras que 9 a 12 días es el tiempo máximo establecido para realizar la expansión de células troncales en tejido de donador cadavérico cuando se mantenga bien conservado para garantizar la viabilidad de las células (**James y cols 2001; Dobrowolski y cols 2011**). Aunque existen diversos materiales donde se pueden expandir estas células, la membrana amniótica ultracongelada es la que se ha utilizado con mayor frecuencia como acarreador y soporte, obteniendo resultados favorables en el tratamiento de la deficiencia de células troncales de limbo. La membrana amniótica es la capa más interna que se encuentra en contacto con el líquido amniótico y el feto y se ha utilizado como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular. Es un tejido avascular, con baja

antigenicidad y tiene propiedades inmunosupresoras (**Garfias y cols 2011; Dominguez-Lopez y cols 2014**). Aunque la expansión *in vitro* de las células troncales se ha realizado también en membrana amniótica deshidratada, se ha demostrado que los resultados son inferiores debido al bajo potencial de crecimiento celular en comparación con la membrana amniótica ultracongelada (**Thomasen y cols 2009**); por ello se prefiere realizar la expansión celular usando membrana amniótica ultracongelada. La expansión *in vitro* de las células troncales sobre membrana amniótica favorece la interacción con el nicho del limbo y con ello favorece la re-epitelización corneal; así mismo el uso de explantes completos para realizar el crecimiento influye en la conservación de los marcadores de troncalidad de estas células (**Kolli y cols 2008**).

Marcadores celulares troncales en el limbo.

Aunque no existen marcadores específicos para identificar a las células del limbo corneal, se ha propuesto la presencia de marcadores de troncalidad como ABCG2 y la ausencia de marcadores de diferenciación como citoqueratina 3 (**Takacs y cols 2009**). La ausencia de un marcador definitivo para la identificación de estas células ha contribuido a la identificación de varios marcadores y su asociación con el resultado clínico después del trasplante celular, éste es el caso del marcador $\Delta Np63\alpha$. Las células troncales del limbo se caracterizan por la expresión del factor nuclear de transcripción p63, que se expresa específicamente en las células basales epiteliales quiescentes del limbo (**Pellegrini y cols 2001**). La alta expresión de esta molécula en más de 3% de células troncales epiteliales del limbo se ha asociado con el éxito del trasplante en un 70%, mientras que la expresión baja en menos de 3% de las células se ha asociado sólo con un 11% de éxito a largo plazo (**Rama y cols 2010**).

El principal reto para una caracterización adecuada de las células del limbo esclerocorneal es la presencia de un marcador concluyente, por ello se ha propuesto la presencia de algunos marcadores celulares así como la ausencia de otros. En la **Tabla 1** se resumen los marcadores cuya presencia y ausencia se han asociado con las células troncales del limbo esclerocorneal.

Tabla 1. Marcadores que se han asociado con las células troncales del limbo.

	Células Troncales del Limbo	Células del Epitelio Corneal
CK5	+++	-
CK14	+++	-
CK19	+++	-
ΔNp63a	+++	-
ABCG2	+++	-
ABCB5	+++	-
Notch-1	+++	-
Integrina a9	+++	-
SSEA4	-	-
CD71	++	+
α enolasa	+++	+/-
Integrina a 6	+++	+
Conexina 43	-	++
CK3	-	+++
CK12	-	+++

CK: citoqueratin; ABCG2: ATP-binding cassette sub –family G member 2; ABCB5: ATP-binding cassette sub –family B member 5; SSEA4: Stage-specific embryonic antigen-4

Hasta este momento, ningún marcador molecular adecuado para el aislamiento de células de limbo para uso clínico se encuentra disponible, lo que no ha permitido el uso de injertos puros de células troncales en la clínica.

ABCB5 como nuevo marcador de troncalidad

Las proteínas transportadoras de membrana pueden ser de 4 tipos: canales de iones, transportadoras, acuaporinas y bombas dependientes de ATP; dentro de éstas últimas se incluyen las bombas ABC (por sus siglas en inglés de *ATP-binding cassette*), que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para mover sustratos a través de la membrana en contra de un gradiente (**Vasiliou y cols 2009**). El grupo ABC constituye una superfamilia, que en el ser humano abarca 49 genes y 7 subfamilias designadas de la A a la G; la subfamilia B de 11 genes es única en los mamíferos, y muchos de sus miembros se sabe que confieren resistencia multi-fármacos a células tumorales (**Vasiliou y cols 2009**).

La expresión de ABCB5 se ha descubierto en subpoblaciones de múltiples células troncales de cáncer o tumorales, y entre otros tipos de cáncer se han descrito: el melanoma, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer colorrectal y carcinoma escamoso oral (**Jongkhajornpong y cols 2016**). A nivel ocular, se ha descrito que ABCB5 se expresa de manera elevada en las neoplasias escamosas de superficie ocular, sugiriendo que pudiera estar involucrado en su patogénesis (**Jongkhajornpong y cols 2016**). También, un estudio realizado en un modelo murino de melanoma conjuntival, demostró la expresión de ABCB5 en diferentes etapas del desarrollo tumoral, y que también desempeña una función en el potencial metastásico del tumor (**de Waard y cols 2015**).

Recientemente, se ha descrito que ABCB5 se co-expresa con el $\Delta Np63\alpha$ en el epitelio basal del limbo y se ha propuesto como un posible marcador de seguimiento del trasplante de células de limbo (**Ksander y cols 2014**). Más aún, se ha demostrado que ABCB5 es un marcador molecular único permitiendo el aislamiento prospectivo de poblaciones puras de células troncales de limbo de tejido humano con la exclusiva capacidad de restaurar completamente la córnea en modelos preclínicos de deficiencias de células madre del limbo (**Frank y Frank 2015**). Además, en ratones con ausencia de ABCB5, se mostró una diferenciación corneal defectuosa manifestada por aumento de fragilidad corneal, celularidad corneal disminuida y expresión disminuida de marcadores de diferenciación corneal como PAX6 y KRT12, revelando una función esencial en el desarrollo corneal normal (**Ksander y cols 2014**).

ANTECEDENTES

Existen diversos estudios donde se reportan los resultados clínicos del trasplante de células de limbo expandidas *in vitro* en la deficiencia de células troncales. Estos estudios clínicos se han realizado en diferentes países como Australia, Alemania, India, Irán, Italia, Japón, Taiwán, Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica (**Baylis y cols 2011**). Se han utilizado células autólogas, heterólogas de donador vivo relacionado y de donador cadavérico. El método más común de expansión ha sido el uso de explantes, sin embargo, también se ha usado la suspensión celular obtenida por digestión enzimática. Así mismo, se han usado diferentes sustratos donde crecen las células, como por ejemplo el uso: de lentes

de contacto, fibroblastos fetales murinos irradiados, fibrina; sin embargo la membrana amniótica des-epitelizada se ha usado en la mayoría de los estudios como sustrato (**Thomassen y cols 2009**). El empleo de suero fetal bovino irradiado con rayos gamma sigue siendo la opción principal para el crecimiento de células troncales epiteliales del limbo esclerocorneales para uso en la clínica (**Baylis y cols 2011**).

Los resultados clínicos óptimos después del trasplante, dependen en gran medida de la calidad del cultivo de limbo usado para preparar los injertos, con el mejor control de calidad siendo la determinación de células troncales epiteliales de limbo (**Lužnik y cols 2016**). En un estudio de seguimiento a largo plazo de trasplante de células epiteliales del limbo expandidas *in vitro*, realizado en co-cultivo celular con fibroblastos murinos realizando la expansión celular de células autólogas del ojo contralateral sobre fibrina, ha demostrado que hay una fuerte asociación ($p < 0.05$) entre la expresión de p63 y la supervivencia del trasplante (**Rama y cols 2010**). El marcador p63 es una proteína intracelular que se puede localizar inclusive en el núcleo de células epiteliales del limbo expandidas *in vitro*. La metodología que usó este grupo para identificar la presencia de este marcador fue por inmunofluorescencia (**Di Iorio y cols 2006**). A pesar de ello, en la actualidad no se ha demostrado que la presencia de esta proteína influya directamente en la generación del epitelio corneal.

Por otro lado, se ha reportado que ABCB5 es una proteína transmembrana identificada como marcador progenitor de piel y células de melanoma y funciona como regulador de diferenciación celular (**Frank y cols 2003**). Además, se ha demostrado que el ABCB5 marca específicamente células de limbo corneales y es necesario para el mantenimiento, reparación y desarrollo del epitelio corneal (**Ksander y cols 2014**). Así mismo, después del aislamiento de las células ABCB5+ murinas o humanas mediante citometría de flujo, estas células han demostrado poseer la capacidad de regenerar la córnea en un modelo de trasplante xenogénico o singénico (**Ksander y cols 2014**).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La deficiencia de células epiteliales troncales de limbo por distintas etiologías afecta la calidad de vida de los pacientes. El trasplante de células epiteliales del limbo expandidas *in vitro* es un procedimiento aplicable a los pacientes que presentan deficiencia severa de

células de limbo, idealmente bilateral. ABCB5 es una proteína presente en la membrana celular, candidata como marcador fundamental en la generación del epitelio corneal, valorable en el trasplante de células epiteliales del limbo. La deficiencia bilateral de células de limbo, aunque con baja incidencia, afecta de forma importante la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se presentan la expresión y presencia de ABCB5 y de $\Delta Np63\alpha$ en las células epiteliales del limbo expandidas *in vitro* que serán trasplantadas en pacientes con deficiencia bilateral de células troncales del limbo?

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe la tecnología para restablecer la estabilidad corneal en pacientes con deficiencia de células epiteliales del limbo, identificando al factor de transcripción intracelular/intranuclear $\Delta Np63\alpha$ como un marcador pronóstico de supervivencia del injerto, sin embargo, no se ha identificado que este marcador constituya un factor determinante en la fisiopatología de la reconstrucción corneal. Además, el aislamiento y purificación de estas células no es posible debido a su localización intracelular. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la molécula ABCB5 es un marcador localizado en la membrana celular y se ha determinado directamente su función como regulador en la regeneración del epitelio corneal, estas características hacen de esta proteína un candidato para ser estudiado en la realización de trasplantes de células epiteliales cultivadas *in vitro*. Así mismo, su localización extracelular podría favorecer la purificación de las células epiteliales del limbo y enriquecer poblaciones celulares para su uso terapéutico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la expresión y presencia de ABCB5 y de $\Delta Np63\alpha$ en las células limbales expandidas sobre membrana amniótica des-epitelizada para el trasplante de células

epiteliales para la reconstrucción de la superficie corneal en pacientes con deficiencia bilateral de células troncales del limbo.

Objetivos específicos

*Describir los resultados clínicos del trasplante de células limbales expandidas *in vitro* en los pacientes con deficiencia de células de limbo.

*Comparar los resultados clínicos preoperatorios con los resultados clínicos posoperatorios.

*Cuantificar la expresión de marcadores de pluripotencialidad ABCB5 y $\Delta Np63\alpha$.

ESTRATEGIA METODOLÓGICA

Diseño del estudio

Es un ensayo clínico, no aleatorizado, no enmascarado, monitorizado por al menos 3 meses.

Descripción de variables

Deficiencia de células de limbo: es una enfermedad determinada clínicamente por la inestabilidad de la superficie ocular, que se lleva a cabo por la pérdida o disfunción de las células epiteliales del limbo esclero-corneal. Se manifiesta histológicamente por la presencia de células caliciformes en la superficie corneal y ausencia o disminución de células epiteliales corneales del limbo.

Vascularización corneal: identificación de crecimiento de vasos dirigiéndose hacia el centro sobre la córnea. Este crecimiento se observa desde el limbo esclero-corneal y puede llegar a cubrir la córnea en su totalidad.

Opacidad corneal: pérdida de la transparencia del estroma corneal. Se relaciona con la presencia de vasos y con la presencia de edema corneal.

Criterios

Criterios de inclusión

1. Cualquier paciente con deficiencia severa bilateral de células del limbo, a causa de quemadura térmica, química, inmunológica, o de origen congénito.

2. Pacientes con citología de impresión corneal o microscopía confocal positiva para células productoras de mucina.
3. Pacientes con resultados ecográficos y potenciales visuales evocados dentro de parámetros normales.
4. Pacientes que acepten participar en el estudio y que firmen el consentimiento informado (Anexo 1).

Criterios de exclusión

1. Pacientes con enfermedades inmunológicas oculares activas no controladas.

Criterios de eliminación

1. Pacientes que libremente retiren su consentimiento en cualquier momento del estudio.

Fases del Estudio

*Fase I: Reclutamiento / Incorporación al estudio.

Identificación de pacientes.

Invitación a participar en el estudio.

Obtención de Consentimiento Informado.

*Fase II: Preparación del aloinjerto y análisis del mismo.

Obtención de amnios y preparación de tejido amniótico.

Obtención de rodets esclero-corneales.

Expansión *in vitro* de células de limbo sobre amnios.

*Fase III: Cirugía de trasplante.

Preparación del lecho quirúrgico.

Trasplante del aloinjerto.

*Fase IV: Seguimiento.

Seguimiento en el posoperatorio inmediato.

Control de complicaciones y efectos adversos

*Fase V: Clausura / Terminación del estudio

Reporte final de resultados

MATERIAL Y MÉTODOS

Fase I: Reclutamiento / Incorporación al estudio

Los pacientes a los que se les invitó a participar en el estudio fueron valorados en el servicio de córnea del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. De manera inicial se determinó que el grado de deficiencia de células de limbo fuera grave o total y bilateral. A los pacientes se les realizó citología de impresión y microscopía confocal para determinar la afectación del epitelio corneal, de la misma manera se les realizaron potenciales evocados y ecografía del polo posterior. Una vez que se determinó que los pacientes contaban con los criterios de inclusión, se les invitó a participar en el estudio. Se les pidió que conocieran a detalle el protocolo y que firmaran por voluntad propia el consentimiento informado.

*Microscopia confocal *in vivo*: Se realizó la microscopia según lo reportado previamente por Shortt y colaboradores (**Shortt et al 2008**). Los resultados se reportaron como presencia de células epiteliales, conjuntivales o mixta.

*Citología de impresión: Los hallazgos se reportaron de manera similar que la microscopia confocal *in vivo*.

*Cuestionario de calidad de vida: Fue necesario determinar la calidad de vida pre y postoperatoria debido a que es importante considerar el tratamiento de trasplante de células de limbo expandidas *in vitro* de manera integral en la vida del paciente incluyendo aspectos físicos, emocionales, socioeconómicos así como los síntomas de dolor y enfermedad. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el cuestionario NEI-VFQ-25 modificado (**Miri y cols 2010**) (Anexo II).

Fase II: Preparación del aloinjerto y análisis del mismo

Obtención de la placenta y preparación del amnios: Las placentas fueron obtenidas de donadoras voluntarias sanas, con pleno uso de sus facultades mentales, cursando con un embarazo eutócico y controlado, sin patología placentaria, en la que contaron con todos los estudios (panel viral, química sanguínea, biometría hemática, examen general de orina) realizados previamente sin infecciones transmisibles, de cesárea sin trabajo de parto, y aceptaron libremente donar su amnios y firmar un consentimiento informado.

Des-epitelización de la membrana amniótica criopreservada: El tejido amniótico se obtuvo del Banco de Amnios del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. Se descongeló la membrana amniótica a temperatura ambiente. Se lavó tres veces en PBS para eliminar el glicerol residual. Se des-epitelizó mediante técnica enzimática usando dispasa II a concentración de 1.2 UI/ml durante 30 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Se retiró el epitelio con hisopos hasta ser observada bajo microscopio invertido la completa des-epitelización. Las membranas des-epitelizadas fueron transferidas y colocadas en un portaobjetos del mismo tamaño con el lado epitelial hacia arriba. El cultivo celular se realizó en placas de 6 pozos.

Obtención del rodete esclerocorneal: Se obtuvo el tejido corneoescleral de rodetes del Banco de Ojos del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. Al rodete corneoescleral se le realizaron pruebas de crecimiento microbiológico en medio de Brain Heart Infusion, cuando éstas resultaron negativas, se procedió a la expansión celular. Se utilizaron rodetes de 5 a 9 días de procurado el tejido corneal.

Cultivo de células epiteliales. Los cultivos celulares fueron procesados bajo medidas asépticas y de esterilidad en una campana de seguridad biológica Clase IIA/B3 (Forma Scientific). El tejido se lavó en tres ocasiones con solución salina de fosfatos (PBS). Se removió el exceso de conjuntiva, cápsula de Tenon, iris y endotelio con una hoja de bisturí recta; además se removió la mayor parte de esclera de forma que sólo se trabajó con 1 mm de tejido adyacente al limbo corneoescleral. El tejido obtenido se colocó en 1ml de dispasa II (1.2 U/ml) seguido de una incubación de 30 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Se realizó un lavado con PBS y usando una hoja de bisturí se obtuvieron explantes de aproximadamente 4 mm². Se colocó un explante con la cara epitelial hacia arriba en el centro de cada membrana amniótica des-epitelizada. Se agregaron 25 µl de SFB sobre el explante y se incubó toda la noche a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad promoviendo así la adhesión del explante en la membrana amniótica. Se agregaron 3 ml de medio DMEM-F12 (Dulbecco’s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 0.5% dimetilsulfóxido (DMSO), 2 ng/ml Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF), 5 µg/ml insulina, 5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml selenio, 0.5µg/ml hidrocortisona, 30 ng/ml toxina colérica, 50 µg/ml gentamicina, 1.25 µg/ml anfotericina B y 50U/ml penicilina-estreptomina a cada pozo del

cultivo celular. Finalmente se colocaron en incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad (**Figura 1**). Se realizaron 6 injertos por ensayo. El cambio de medio se realizó cada tercer día y la supervisión del crecimiento celular se llevó a cabo bajo un microscopio invertido durante 2-3 semanas hasta obtener una monocapa uniforme.



Figura 1: Imágenes del proceso de generación de los injertos en cultivo celular. A: Lavado y des-epitelización de la membrana amniótica. B: Corte del rodete esclero-corneal en fragmentos. C: Cultivo celular de explantes de limbo sobre membrana amniótica.

Expresión de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ por citometría de flujo:

Para determinar el porcentaje de expresión de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ por citometría de flujo, la monocapa de células epiteliales expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica se obtuvo mediante digestión enzimática. El injerto se lavó tres veces con PBS. Se adicionó 3-4ml de tripsina PBS- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra acético) al 0.25% y se incubó durante 7-9 min a 37°C. La reacción enzimática se detuvo adicionando medio DMEM-F12 suplementado con SFB al 10%. Las células epiteliales obtenidas se centrifugaron a 800 rpm 4°C por 5 minutos. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min 4°C seguido de un lavado con PBS. El botón celular se re-suspendió en 1ml de PBS y el volumen obtenido se colocó en tres tubos de citometría. El tubo 1 se utilizó como control de autofluorescencia (CAF), al tubo 2 se le realizó doble tinción con los anticuerpos ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ y el tubo 3 se utilizó como control de los anticuerpos secundarios (**Tablas 2 y 3**).

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para citometría de flujo e inmunofluorescencia

Anticuerpo	Tipo	Isotipo	Reactividad	Especie	Dil. IHC	Dil. FACS
ABCB5	Monoclonal	IgG	Humano	Ratón	1:200	1:10
$\Delta p63\alpha$	Policlonal	IgG	Humano	Conejo	1:100	1:10

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para citometría de flujo e inmunofluorescencia

Anticuerpo	Isotipo blanco	Reactividad	Especie	Dil. IHC	Dil. FACS
Alexa Fluor 488	IgG	Conejo	Asno	1:200	1:10
Alexa Fluor 594	IgG	Ratón	Cabra	1:500	1:10

Para realizar la tinción membranal se incubó con 60 μ L del anticuerpo contra ABCB5 (Abcam®, cat: ab140667) por 15min a 4°C. Se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 800 rpm 4°C por 5min. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (Invitrogen®, cat: A11005) con las condiciones antes descritas y en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS. Posteriormente, se permeabilizaron las células usando 100 μ L de cytofix/cytoperm (BD Biosciences®, Cat: 51-2090KZ) durante 20 min a 4°C seguido de un lavado con Perm Wash (BD Biosciences®). Se realizó la tinción intracelular con 60 μ L del anticuerpo contra $\Delta p63\alpha$ (BioLegend®, Cat: 619001) durante 15 min a 4°C. Se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 por 15min a 4°C en oscuridad y se realizó un lavado final con PBS. Todas las muestras se adquirieron en un citómetro FACS calibur, adquiriendo 10,000 eventos por cada muestra. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Cell Quest Pro.

RT-PCR:

Para la detección de transcritos génicos humanos específicos, el RNA total se aisló de las células expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica usando el kit RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, cat: 74106). Se cuantificó la concentración del RNA total en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (thermo scientific®).

Se diseñaron oligonucleotidos específicos de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ usando el programa primer3 v.0.4.0 (**Tabla 4**). Se utilizó como gen constitutivo a B2 microglobulina. La concentración de RNA total fue de 10ng y la amplificación de los genes se realizó con el kit (KAPA SYBR FAST Universal One Step qRT-PCR; KAPA BIOSYSTEMS, cat: KR0393) siguiendo el protocolo de la **Tabla 5**.

Tabla 4. Secuencias de primers diseñados para ABCB5, $\Delta p63\alpha$ y B2 microglobulina				
Oligo	Secuencia 5'-3'	Tamaño (nt)	Tm (°C)	Producto (pb)
$\Delta p63\alpha$	F: GGAAAACAATGCCAGACTC	20	57.1	150
	R: CACAGTTTCGACGTGTCCTTC	21		
ABCB5	F: GACCAAGGCGACTGTCTCTC	20	58.7	224
	R: TTGAAACCTTCGCAATAGCC	20		
B2 microglobulina	F: CACCCCCACTGAAAAAGATG	20	53.8	180
	R: ATATTA AAAAGCAAGCAAGCA	21		

Tabla 5. Condiciones de la transcripción reversa para cada uno de los RNAs		
	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Master Mix	1X	5.0 μ l
dUTP	0.2 mM	0.2 μ l
Primer Forward	200 nM	0.2 μ l
Primer Reverse	200 nM	0.2 μ l
RT-Mix	1X	0.2 μ l
Agua	Variable	Variable

RNAtotal	10 ng	Variable
	Volumen final	10 μ L

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Corbett Research®) con el siguiente protocolo: 42°C/5min, 95°C/3min, 95°C/3sec, 60°C/20sec Tm variable, por 35 ciclos; con lecturas de fluorescencia cada 1°C. Se utilizó el programa de Rotor gen para obtener los datos del CT. Se realizaron cálculos a partir de los CTs obtenidos para el análisis de expresión relativa en los ensayos por medio de la siguiente fórmula:

$$\Delta CT = CT \text{ de gen constitutivo} - CT \text{ del gen problema}$$

Inmunofluorescencia: Se realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$. Se obtuvieron muestras representativas de los cultivos de las células de limbo expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica. Se realizaron 3 lavados con PBS, se fijaron las membranas con solución de Bouin (ácido pícrico 50mL, formaldehído al 37%-40% 16.6 mL y ácido acético 3.3 mL) durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron 10 lavados hasta eliminar la mayor cantidad de solución de Bouin. Se desmontó la membrana amniótica del portaobjetos y se colocó en papel filtro. A continuación se deshidrató la muestra en diferentes concentraciones de alcohol (60%, 70%, 80%, 90% y 100%) por 15 minutos cada uno. Posteriormente, las muestras se colocaron 2 veces en xilol durante 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo se colocaron las muestras en parafina durante 30 minutos. Se utilizó un micrótopo para realizar cortes de 3-5 μ m, se colocaron en laminillas previamente cargadas con poli-L-lisina.

Los cortes se desparafinaron, se realizó recuperación antigénica con solución de citratos 1x (10 mM pH 6) durante 10 minutos, se bloquearon las muestras con solución de bloqueo (PBS 1x, tritón 0.1%, BSA 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se adicionó el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-tween 20.

Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalizado el tiempo de incubación se realizaron

3 lavados y se incubaron con DAPI-VectaShield para contrastar los núcleos (Sigma®, Cat: F6057). Se realizaron 5 laminillas por ensayo para los diferentes marcadores (**Tabla 6**). Las laminillas fueron observadas en un microscopio ApoTome.2 Imager.Z2 (Carl Zeiss®)

Tabla 6. Forma de tinción de los marcadores ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ para inmunofluorescencias.				
	Laminilla 1	Laminilla 2	Laminilla 3	Laminilla 4
1rio. ABCB5	+	-	+	-
2rio. ABCB5	+	-	+	+
1rio. $\Delta p63\alpha$	-	+	+	-
2rio. $\Delta p63\alpha$	-	+	+	+

La densidad celular se realizó mediante el conteo de núcleos celulares teñidos con DAPI del ensayo 10. Se obtuvieron imágenes representativas de 6 campos diferentes de una monocapa uniforme de células epiteliales expandidas sobre membrana amniótica. Se realizó el conteo celular de forma manual por 3 evaluadores independientes y se obtuvo un promedio. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio ApoTome.2 Imager.Z2 (Carl Zeiss)

Fase III: Cirugía de trasplante

Preparación del lecho quirúrgico: Posterior a una peritomía conjuntival de 360 grados, se disecaron de la córnea y el limbo el pannus fibrovascular y la conjuntiva que invadían la superficie. La hemostasia se realizó mediante electrocauterio.

Trasplante del aloinjerto: El aloinjerto cultivado se colocó en la superficie corneal y límbica. La membrana amniótica se colocó con el estroma en contacto con la superficie corneal y conjuntival. Las células expandidas estuvieron en contacto con la película lagrimal por un momento, antes de la colocación de una segunda membrana amniótica sobre el injerto. El injerto y la membrana se adhirieron con adhesivo tisular, o se suturaron con Nylon 10/0 de acuerdo al caso.

Fase IV: Seguimiento

Manejo y cuidados en el posoperatorio inmediato: El principio básico es el control de la inflamación, profilaxis en contra de infecciones, protección mecánica del trasplante y prevención del rechazo del injerto. Se usaron en todos los casos esteroides tópicos y antibióticos de amplio espectro. Se agregó el uso de suero autólogo al 50% preparado del paciente. Se utilizó prednisona 1mg/kg/día para evitar el riesgo de rechazo agudo del aloinjerto con posterior reducción de la dosis. Se usó un lente de contacto terapéutico como protección mecánica del injerto. Se empleó ciclosporina A 150-200 mg/día los primeros 2 meses con reducción a 25-50 mg/día hasta los seis meses. De acuerdo a la evolución de los pacientes se evaluó si se podía eliminar completamente la inmunosupresión sistémica.

Seguimiento: El seguimiento de los pacientes se realizó de forma seriada, con revisión al día 1, semana 1, semana 3 y semana 6 postoperatorio, con posterior seguimiento mensual o bimensual de acuerdo a la evolución del paciente. En todos los casos se realizaron las pruebas que se describen a continuación:

*Evaluación Clínica Objetiva: Se realizó una evaluación propuesta por Baradaran-Rafii y colaboradores (**Baradaran -Rafii y cols 2010**), en donde se usa un sistema de graduación del 1+ al 4+ basado en fotografías de lámpara de hendidura para determinar el grado de transparencia corneal y vascularización superficial considerando al estado preoperatorio como 4+.

*Agudeza visual: Se determinó la agudeza visual en todos los pacientes en cada una de las visitas con cartilla de Snellen o con cartilla de Feinbloom de acuerdo al caso. Cuando la agudeza visual era muy baja, se valoraba la posibilidad de contar dedos a 30 cm, ver movimiento de manos o percibir luz con o sin discriminación de colores.

Tabla 7. Tabla de variables del estudio.

Definición	Tipo		Escala de medición	Unidad de medición	Definición operacional	Instrumento de medición
Evaluación clínica objetiva	Independiente	Cualitativa	Ordinal	0 a 4	Mejoría en transparencia epitelial y vascularización superficial	Biomicroscopia con lámpara de hendidura y fotografías clínicas

Morfología celular en microscopía confocal <i>in vivo</i>	Independiente	Cualitativa	Nominal	Células epiteliales, conjuntivales o mixta	Características celulares de acuerdo a resultado del estudio	Microscopio Confocal
Morfología celular en citología de impresión	Independiente	Cualitativa	Nominal	Células epiteliales, conjuntivales o mixta	Características celulares de acuerdo a resultado del estudio	Citología de impresión
Cuestionario de calidad de vida	Independiente	Cuantitativa	Discreta	0 a 100	Resultado del cuestionario establecido	Cuestionario NEI-VFQ-25 modificado
Agudeza visual	Independiente	Cuantitativa	Continua	logMAR	Agudeza visual en ojo tratado convertida a escala logarítmica	Cartilla Snellen

Registro y aprobación del protocolo

El protocolo fue aprobado por los distintos comités del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” con las siguientes características:

- Comité de investigación: Aprobado 15 de Diciembre de 2014. CI-051-2014
- Comité de ética: Aprobado 16 de Diciembre de 2014. CEI-2014-/11-/07
- Comité de bioseguridad: Aprobado 4 de Febrero de 2015.

El protocolo está registrado en clinicaltrials.gov con las siguientes características: Protocol ID: CI-051-2014 y clinicaltrials.gov ID: NCT02579993.

Aspectos Éticos

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Esta investigación se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Aspectos de Bioseguridad

Debido a que se trata de un protocolo en el que se utilizaron agentes biológicos tales como tejidos (amnios) y remanentes de tejidos (rodete esclerocorneal), éstos se dispusieron conforme al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos, haciendo especial énfasis en los artículos 74 a 88 del Capítulo V de ese mismo Reglamento. Así mismo, tanto el

investigador responsable como los investigadores asociados tienen el conocimiento en todo lo relacionado al manejo integral en cuanto a uso, recepción y desecho de residuos peligrosos, productos y/o materiales infectocontagiosos, biológicos de cualquier tipo y potencialmente por cualquier causa, como se encuentra dispuesto en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 referente a Protección ambiental – Salud Ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

Las tomas de muestras de los pacientes se realizaron de la manera habitual como se realiza en el laboratorio clínico y como se encuentra señalado en el manual de procedimientos del área. De la misma manera, la intervención quirúrgica de los pacientes y el seguimiento se realizaron en las instalaciones del propio Instituto que cuenta con la licencia sanitaria de establecimientos donde se realizan actos quirúrgicos expedida por la COFEPRIS con número 06-AM-09-006-102.

Para la realización de este proyecto de investigación se contó con todo lo necesario para la expansión *in vitro* de células troncales sobre amnios. De la misma manera se cuenta con la licencia sanitaria de banco de amnios, expedida por la COFEPRIS con número 14-TR-09-015-0006.

Fondos económicos

- CONACYT-Problemas Nacionales: 2015-311
- CONACYT-CIENCIA BÁSICA 167438
- DGAPA UNAM-PAPIIT IN215617
- CVU 668682
- Fundación Conde de Valenciana

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables de acuerdo al caso y al ensayo. Las comparaciones entre grupos de marcadores se realizaron utilizando una prueba T de Student no pareada. Todos los análisis se realizaron con el programa STATA V.13.1 (STATA, College Station, Texas, USA).

RESULTADOS

Estado preoperatorio de los pacientes

Se incluyeron 11 pacientes en el estudio, de los cuales 10 fueron sometidos al trasplante de células epiteliales troncales de limbo expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica y 1 retiró su consentimiento previo a cirugía.

La valoración pre-quirúrgica fue completa en todos los pacientes, con los siguientes hallazgos:

- Ecografía de polo posterior: Retina y coroides en adecuado estado incluyendo la zona macular, además de una excavación del nervio óptico pequeña o mediana.
- Electroretinograma: Trazo registrable.
- Cuestionario de calidad de vida: En la **Tabla 8** se presentan los resultados pre quirúrgicos del cuestionario VFQ-25 modificado de acuerdo a las distintas sub-escalas que considera el cuestionario.

Tabla 8: Resultados pre-quirúrgicos del VFQ-25 modificado. (Anexo 2)

Sub-escala	Promedio	Rango
Salud general	47.25	25 a 75
Visión general	22	20 a 40
Dolor ocular	61.25	37.5 a 75
Actividades cercanas	15	0 a 33.3
Actividades a distancia	15	0 a 33.3
Funcionamiento social	30	12.5 a 50
Salud mental	10.62	0 a 31.25
Dificultades de rol	17.5	0 a 25
Dependencia	15.16	1.6 a 33.3
Conducir	NA	NA
Visión de color	50	0 a 75
Visión periférica	30	0 a 50
Agregadas en cuestionario modificado	55	35 a 65

Valores siendo 100 lo mejor y 0 lo peor en cuanto a calidad de vida. NA= No aplicable en este cuestionario.

- Citología de impresión: Patrón mixto, con presencia tanto de células epiteliales como conjuntivales (**Figura 2**).



Figura 2: Imágenes de citología de impresión. Presencia de células caliciformes con tinción positiva de ácido periódico-de Schiff (PAS) rodeadas de células epiteliales observadas en citología de impresión de pacientes con deficiencia total de células de limbo analizadas en microscopio óptico (PAS, 40x).

- Microscopía confocal: Patrón de sólo conjuntiva (deficiencia completa de células de limbo), o patrón mixto con presencia tanto de células epiteliales corneales como conjuntivales (deficiencia parcial de células de limbo). La presencia de células epiteliales se mostraba con alta reflectividad, elementos cuboidales o poligonales sin bordes adecuadamente definidos, citoplasma hiporrefléctico con un núcleo apenas detectable, acompañados de células con mayor reflectividad que correspondían a las células caliciformes (**Figura 3**).

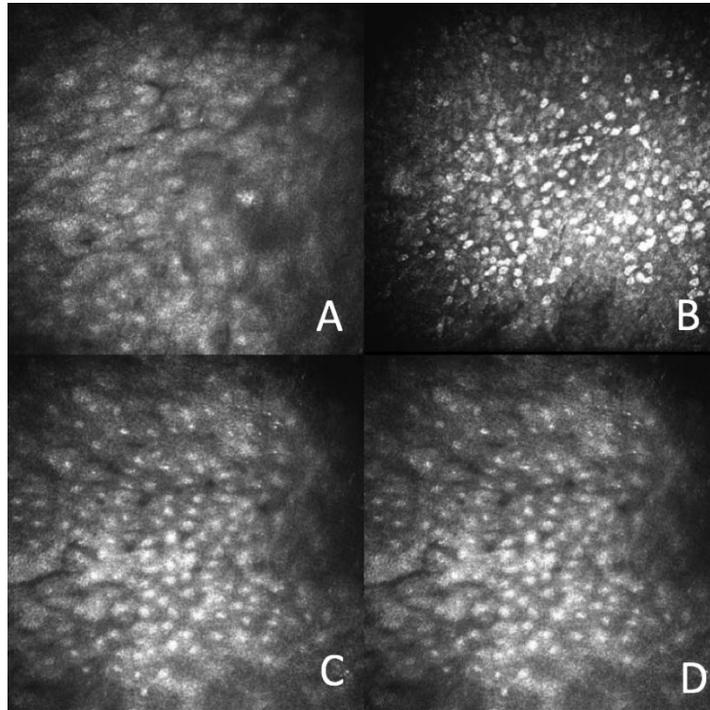


Figura 3: Imágenes de microscopía confocal. A-D: Presencia de células epiteliales con alta reflectividad, elementos cuboidales o poligonales sin bordes adecuadamente definidos, citoplasma hiporrefléctico con un núcleo apenas detectable, acompañados de células con mayor reflectividad que correspondían a las células caliciformes.

Las características clínicas preoperatorias detalladas de los pacientes del estudio se mencionan a continuación; la **Figura 4** muestra imágenes clínicas representativas del estado preoperatorio de los pacientes.

- Paciente 1.

Demografía: Femenino, 50 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Artritis reumatoide y síndrome de Sjögren; iatrogénica (colgajo conjuntival)

Antecedentes oftalmológicos: Queratotomía radiada, 1 queratoplastia penetrante, queratitis bacterianas, colgajo conjuntival.

Agudeza visual: Movimiento de manos (logMAR 3.0)

- Paciente 2

Demografía: Masculino, 60 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Dermatitis ampollosa sub-epidérmica; penfigoide ocular.

Antecedentes oftalmológicos: En 1999 biopsia y en 2000 liberación de simbléfaron.

Agudeza visual: 1/200 (logMAR 2.3)

- Paciente 3

Demografía: Femenino, 52 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Síndrome de Stevens Johnson secundario a neomicina.

Antecedentes oftalmológicos: Antecedente de múltiples perforaciones oculares.

Agudeza visual: Movimiento de manos (logMAR 3.0)

- Paciente 4

Demografía: Masculino, 62 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Panuveítis idiopática.

Antecedentes oftalmológicos: Antecedente de colocación de membrana amniótica.

Agudeza visual: 20/2000 (logMAR 2.0)

- Paciente 5

Demografía: Masculino, 17 años

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Quemadura con álcali.

Antecedentes oftalmológicos: Colocación de membrana amniótica en ambos ojos .

Agudeza visual: 20/2000 (logMAR 2.0)

- Paciente 6

Demografía: Femenino, 32 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Conjuntivitis alérgica de larga evolución.

Antecedentes oftalmológicos: Múltiples tratamientos para conjuntivitis alérgica, colocación membrana amniótica.

Agudeza visual: 20/800 (logMAR 1.6)

- Paciente 7

Demografía: Masculino de 59 años

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Quemadura con hidróxido de calcio.

Antecedentes oftalmológicos: Ojo único, queratoplastía penetrante previa.

Agudeza visual: 20/400 (logMAR 1.3)

- Paciente 8

Demografía: Masculino de 54 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: quemadura térmica por explosión de gas.

Antecedentes oftalmológicos: Ojo único, simbléfaron y anquilobléfaron con reconstrucción usando mucosa oral y cartílago auricular. Perforación corneal tratado con injerto de membrana multicapa, 2 parches conjuntivales y trasplante de córnea. Colocación de pesa de oro en párpado.

Agudeza visual: Movimiento de manos. (logMAR 3.0)

- Paciente 9

Demografía: Masculino de 52 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Quemadura con álcali

Antecedentes oftalmológicos: Queratoplastía penetrante, SLET ambos con falla.

Agudeza visual: 20/300 (logMAR 1.17)

- Paciente 10

Demografía: Femenino de 32 años.

Etiología de deficiencia de células epiteliales troncales de limbo: Aniridia congénita.

Antecedentes oftalmológicos: Cirugía para ptosis congénita bilateral y catarata congénita.

Agudeza visual: 20/300 (logMAR 1.17)

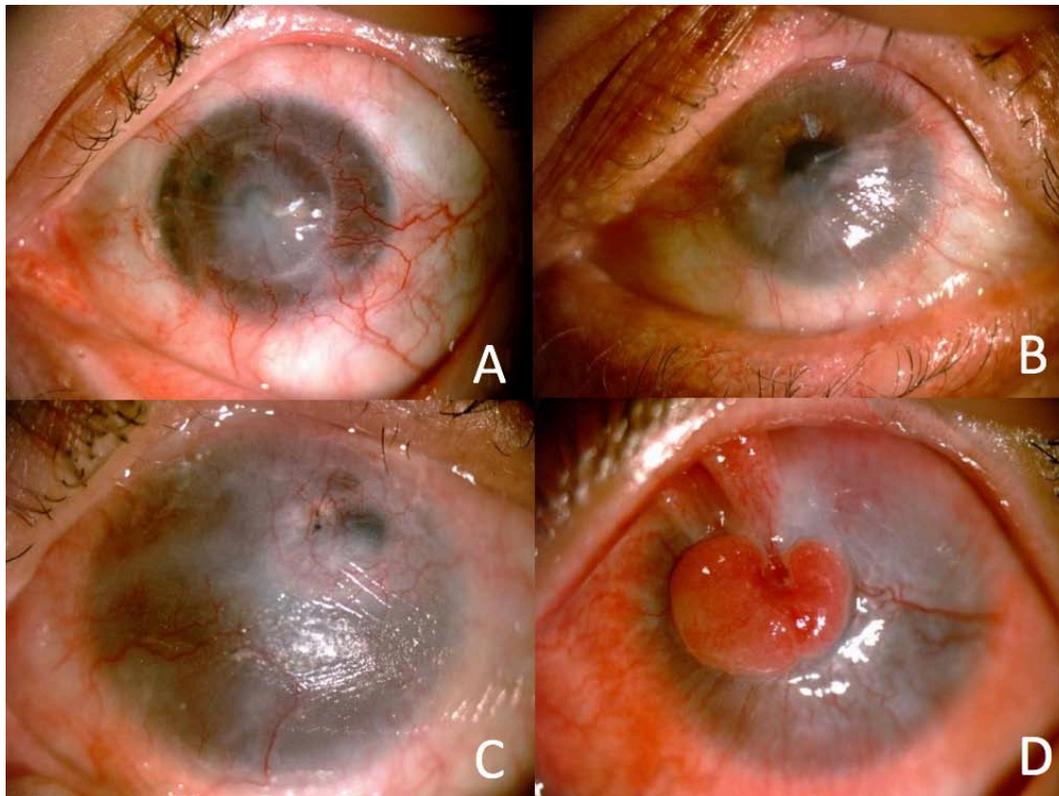


Figura 4: Imágenes clínicas representativas preoperatorias de los pacientes. Se muestran imágenes clínicas obtenidas en exploración por lámpara de hendidura de pacientes con deficiencia total de células de limbo asociada a diversas etiologías como artritis reumatoide (A), penfigoide ocular (B), Síndrome de Stevens Johnson (C) y quemadura con álcali (D).

El resumen de las características clínicas preoperatorias de los pacientes incluidos en el estudio se resume en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Características pre-quirúrgicas de los pacientes incluidos	
Variable	
Edad	Media 47 años (rango 17 a 60 años)
Sexo	6 masculino / 4 femenino
Etiologías	Quemadura química: 3 (30%) Inmunológica (Artritis reumatoide, penfigoide ocular, síndrome de Stevens Johnson): 3 (30%) Quemadura térmica: 1 (10%)

	Panuveítis idiopática: 1 (10%) Conjuntivitis alérgica: 1 (10%) Congénita (aniridia): 1 (10%)
Agudeza visual	Mediana 20/2000, logMAR 2.0 (rango 20/300, logMAR 1.17 a movimiento de manos, logMAR 3.0)

Expansión *in vitro* de células epiteliales del limbo sobre membrana amniótica desepitelizada.

Se realizaron 4 ensayos (3, 5, 8 y 10). La adherencia celular se observó del día 1-3 identificándose células aisladas y acúmulos celulares semejantes a unidades formadoras de colonias (UFC) (**Figura 5**).

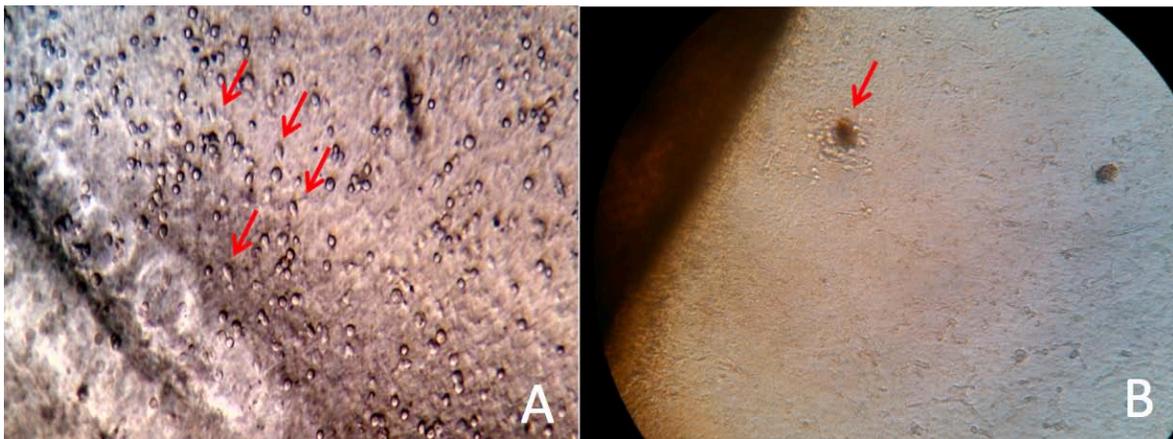


Figura 5. Adherencia celular al tercer día de cultivo celular. A: Células adheridas de forma aisladas (flecha). B: Acúmulos o clonas celulares (flecha)

La tasa de expansión de los cultivos celulares en cada uno de los ensayos fue del 100% y el promedio para la obtención de la monocapa celular fue de 20 días. Las células que migran se adhieren y se extienden sobre la membrana amniótica formando una monocapa uniforme (figura 6A). Las células presentan una morfología de células pequeñas con núcleos prominentes. El crecimiento celular se observa a partir del margen del explante hacia la periferia (figura 6B). El borde de crecimiento puede ser claramente visto a los diferentes días del cultivo (figuras 6B, 6C y 6D).

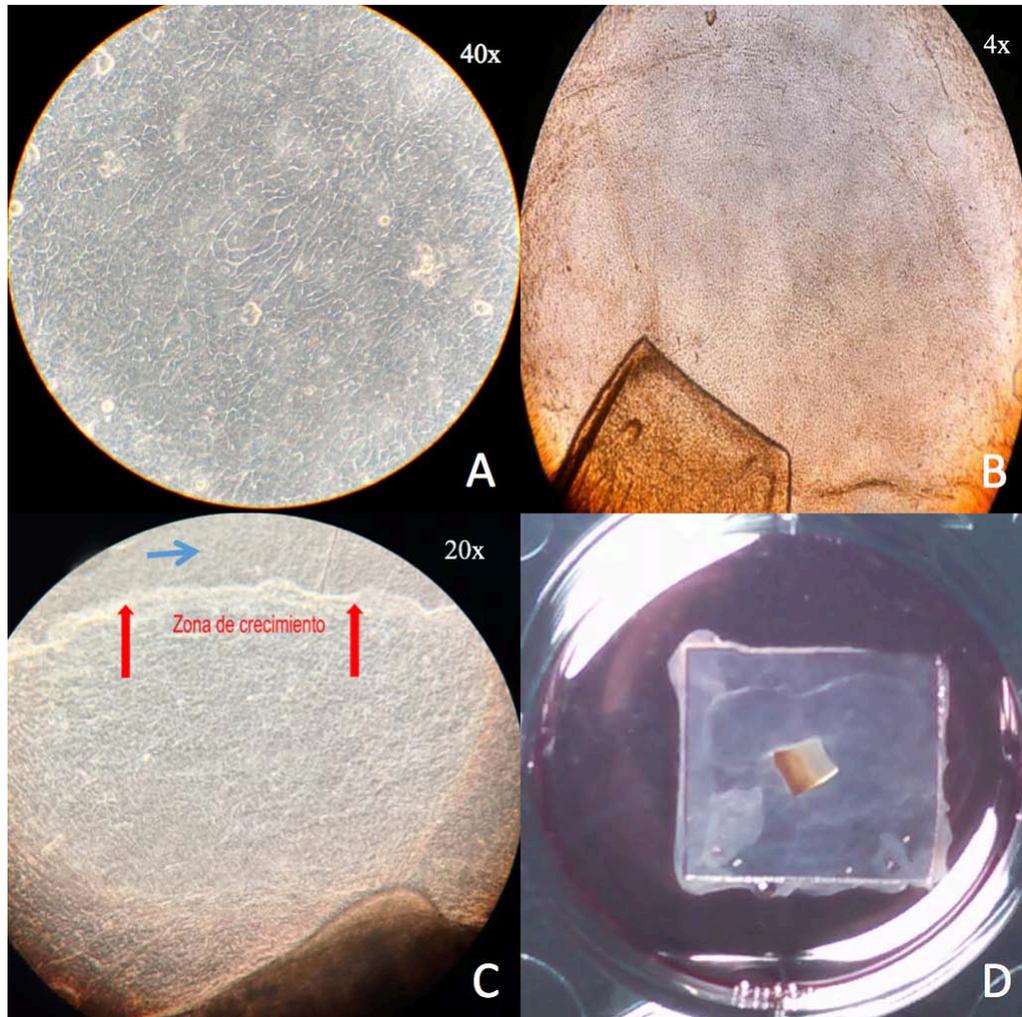


Figura 6: Caracterización y crecimiento de células epiteliales limbales expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica des-epitelizada. A (arriba izquierda): Imagen de microscopio invertido mostrando la unión entre célula-célula, la monocapa confluyente y la morfología clásica de células epiteliales limbales sobre membrana amniótica. B (arriba derecha): Crecimiento de células epiteliales a partir del explante límbico al día 7. C (abajo izquierda): Aparente borde de crecimiento donde se logra diferenciar la presencia o ausencia (flecha azul) de células al día 7. D (abajo derecha): Placa cultivo celular vista a contra luz donde hace evidente el crecimiento celular del explante hacia la periferia al día 10.

Análisis de expresión de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ por citometría de flujo

Las células epiteliales limbales expandidas *in vitro* sobre membrana amniótica se obtuvieron para realizar el análisis de expresión de los marcadores ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ por citometría de flujo. De cada ensayo realizado se tomó un injerto representativo para realizar el análisis de expresión. En la **Figura 7** se observa una gráfica de puntos por citometría de flujo de la población de células epiteliales limbales identificada por tamaño y complejidad (R1). En la **Figura 7** se observan graficas de puntos de R1 que representan en el eje de las abscisas la expresión de $\Delta p63\alpha$ y en el eje de las ordenadas la expresión de ABCB5. El porcentaje de células dobles positivas fue obtenido tomando en cuenta la cifra del cuadrante superior derecho. En la **Figura 8** se observan histogramas de expresión positiva o negativa de los marcadores ABCB5 y $\Delta p63\alpha$, los porcentajes de expresión se obtuvieron mediante histogramas tomando en cuenta los valores de M1.

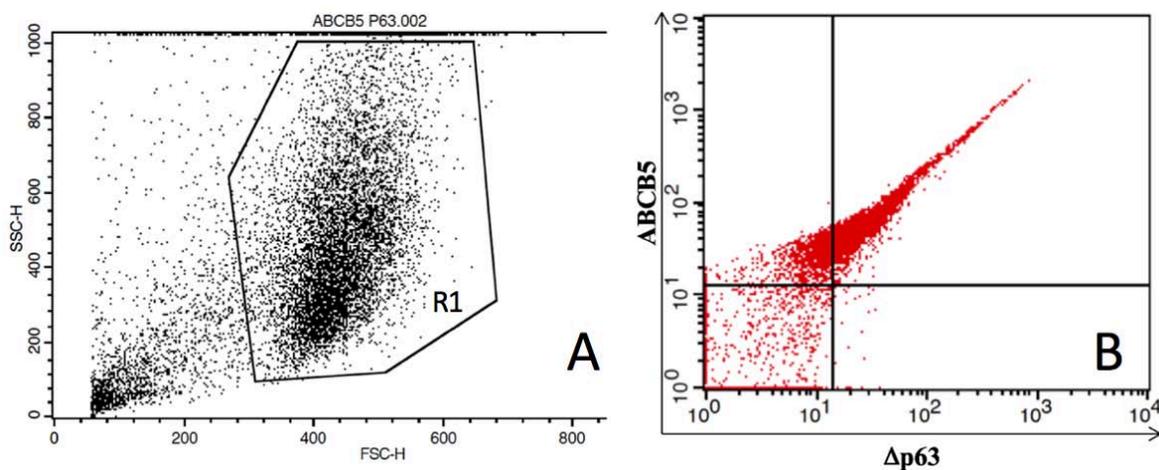


Figura 7: Gráficas de puntos por citometria de flujo para caracterización y expresión de marcadores de células expandidas sobre membrana amniótica. A: Población de células epiteliales limbales por tamaño y complejidad (R1). B: Porcentaje de expresión de marcadores ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ en R1.

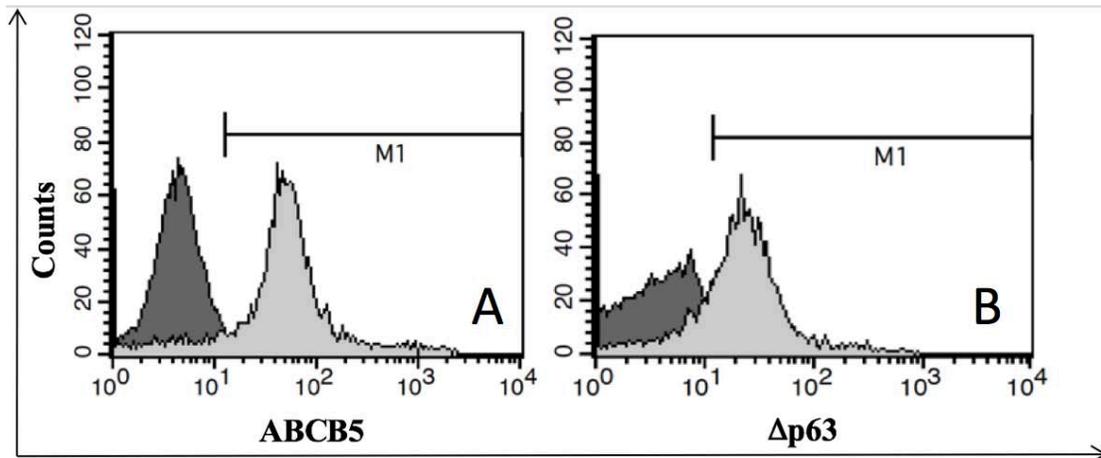


Figura 8: Histogramas de expresión de ABCB5 (A) y $\Delta p63\alpha$ (B). Curva negra. Control de autofluorescencia de células epiteliales limbales. Curva gris. Expresión de ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ respectivamente.

Los valores de expresión de los 3 ensayos para los marcadores son los siguientes: Ensayo 3: Dobles positivas 70.01%, ABCB5+ 82.03% y $\Delta p63\alpha$ + 70.15%. Ensayo 8: Dobles positivas 96.05%, ABCB5+ 94.03% y $\Delta p63\alpha$ + 94.79%. Ensayo 10: Dobles positivas 86.42%, ABCB5+ 85.89% y $\Delta p63\alpha$ + 89.33%.

En promedio considerando todos los ensayos, el porcentaje de células ABCB5+ fue de 87.3% +/- 6.1% y el de $\Delta p63\alpha$ + fue de 84.7% +/- 12.9%, sin mostrar diferencia estadísticamente significativa entre ambas ($p=0.77$, t de Student no pareada).

RT-PCR

En la **Tabla 9** se hace referencia a los valores de CT de los distintos ensayos para ABCB5 y $\Delta p63\alpha$ y ΔCT en relación con el componente constitutivo usado que fue B2 microglobulina. En el ensayo 3 no fue posible obtener el valor de CT de ABCB5. En el resto de los ensayos se hace evidente que $\Delta p63\alpha$ presenta un menor ΔCT , por lo que su concentración parece ser mayor a la comparada con ABCB5, aunque obteniendo el valor promedio de ΔCT de ABCB5 (19.4 +/- 2.3) no mostró diferencia estadísticamente significativa con el valor promedio de ΔCT de $\Delta p63\alpha$ (15.3 +/- 2.9), ($p=0.10$, T de Student

no pareada). La expresión de ambos marcadores $\Delta p63\alpha$ y ABCB5 se hace evidente en la **Figura 9**, contrastando con sus respectivos controles.

Tabla 10: Resultados de RT-PCR de los distintos ensayos realizados para ABCB5 y $\Delta p63\alpha$.

Ensayo	Gen	CT	Δ CT
3	ABCB5	No registrado	No calculable
	$\Delta p63\alpha$	30.88	11.11
	B2 microglobulina	19.77	Constitutivo
5	ABCB5	29.47	16.84
	$\Delta p63\alpha$	28.17	15.54
	B2 microglobulina	12.63	Constitutivo
8	ABCB5	30.65	20.43
	$\Delta p63\alpha$	27.36	17.14
	B2 microglobulina	10.22	Constitutivo
10	ABCB5	31.93	21.15
	$\Delta p63\alpha$	28.29	17.51
	B2 microglobulina	10.78	Constitutivo

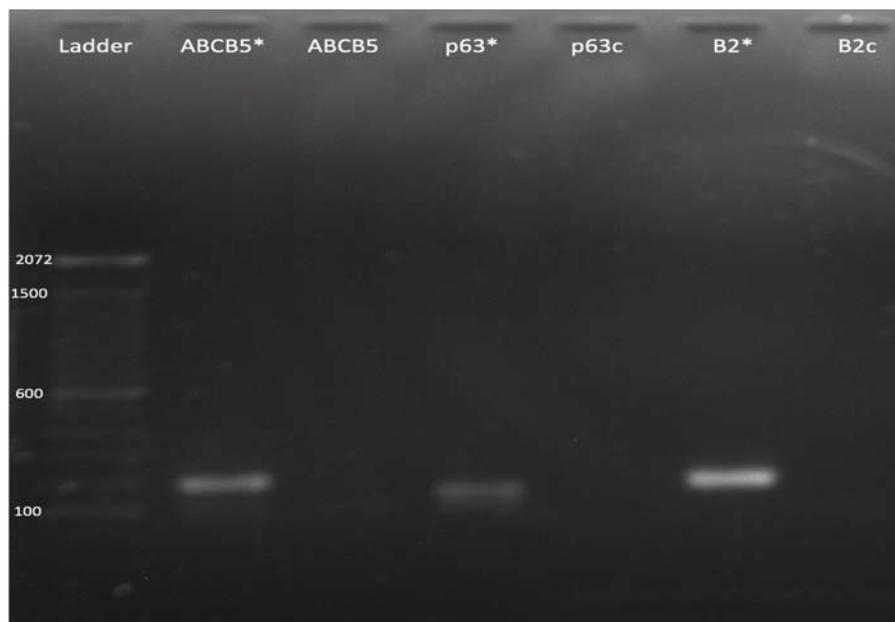


Figura 9: Electroforesis de los productos de amplificación de PCR de ABCB5, $\Delta p63\alpha$ y B2, sin expresión en los respectivos controles.

Inmunofluorescencia

Todos los neotejidos presentaron positividad para $\Delta p63\alpha$ y ABCB5 en igual cantidad. El patrón de tinción de $\Delta p63\alpha$ (verde) se localizó clásicamente en los núcleos, mientras la positividad para ABCB5 (rojo) fue más evidente en la membrana celular y la tinción fue más fuerte que comparada con aquellas células más superficiales; para identificar los núcleos, se realizó tinción con DAPI (azul) (**Figura 10**).

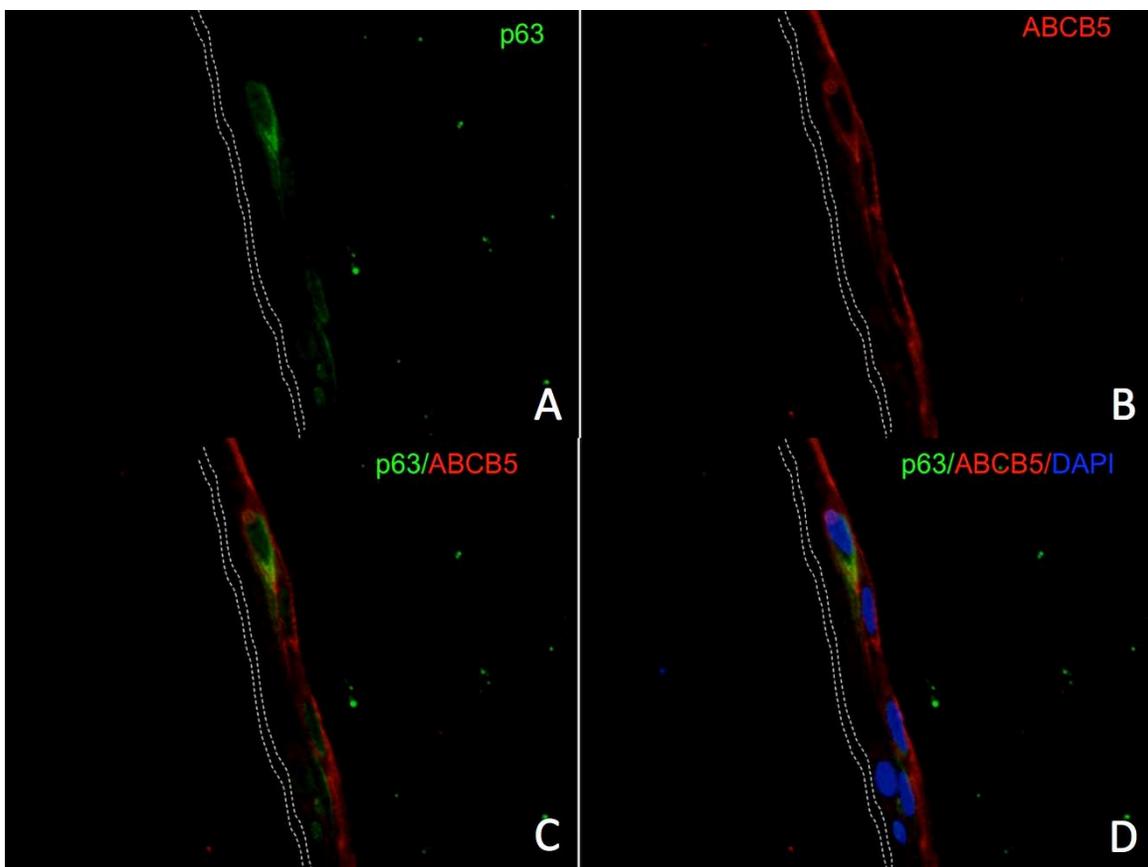


Figura 10: Imágenes representativas de inmunofluorescencia de los marcadores evaluados. Tinción de $\Delta p63\alpha$ en verde localizada en los núcleos (A), tinción de ABCB5 en rojo más evidente en la membrana celular (B), tinción conjunta de $\Delta p63\alpha$ y ABCB5 (C), y agregada tinción de DAPI para co-localizar con núcleos (D). Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia ApoTome Carl Zeiss, 40X.

El resultado del análisis de la densidad celular, dio como resultado un promedio de 82.5 células por campo. Considerando que la membrana amniótica mide 1.9 cm x 1.9 cm o 3.61 cm², y al observar que las membranas amnióticas se encontraban cubiertas en su totalidad por crecimiento celular, se estiman un total de 205,113.6 células epiteliales del limbo en cada una de las membranas, considerando que se trate de una monocapa de células.

Resultados clínicos de los pacientes

Los ensayos fueron realizados y sus respectivos injertos trasplantados en el siguiente orden y fechas:

- Ensayo 3: Paciente 1 el 23 de Marzo de 2015.
- Ensayo 5: Pacientes 2 y 3 el 24 de Abril de 2015 y Paciente 4 el 29 de Abril de 2015.
- Ensayo 8: Pacientes 5 y 6: 16 de Diciembre de 2015.
- Ensayo 10: Pacientes 7, 8, 9 y 10: Principios de Septiembre de 2016.

Ningún paciente presentó complicaciones trans-quirúrgicas. Además, ningún paciente presentó efectos adversos a la administración de los medicamentos tópicos, ni por los esteroides sistémicos o la administración de ciclosporina a lo largo de todo el seguimiento.

El seguimiento de los pacientes 1 a 4 al momento del corte ha sido de 20 meses, de los pacientes 5 y 6 de 12 meses y de los pacientes 7 a 10 de 3 meses, haciendo una mediana de seguimiento de 11.6 meses (3 a 20 meses). Se presentaron 7 fallas (7/10, 70%) en los pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. En 2 pacientes (20%) hasta este momento del seguimiento se considera como mejoría, en comparación con el cuadro clínico preoperatorio, que son los pacientes 8 y 10, los cuales fueron trasplantados con el ensayo 10 (**Figura 11**).

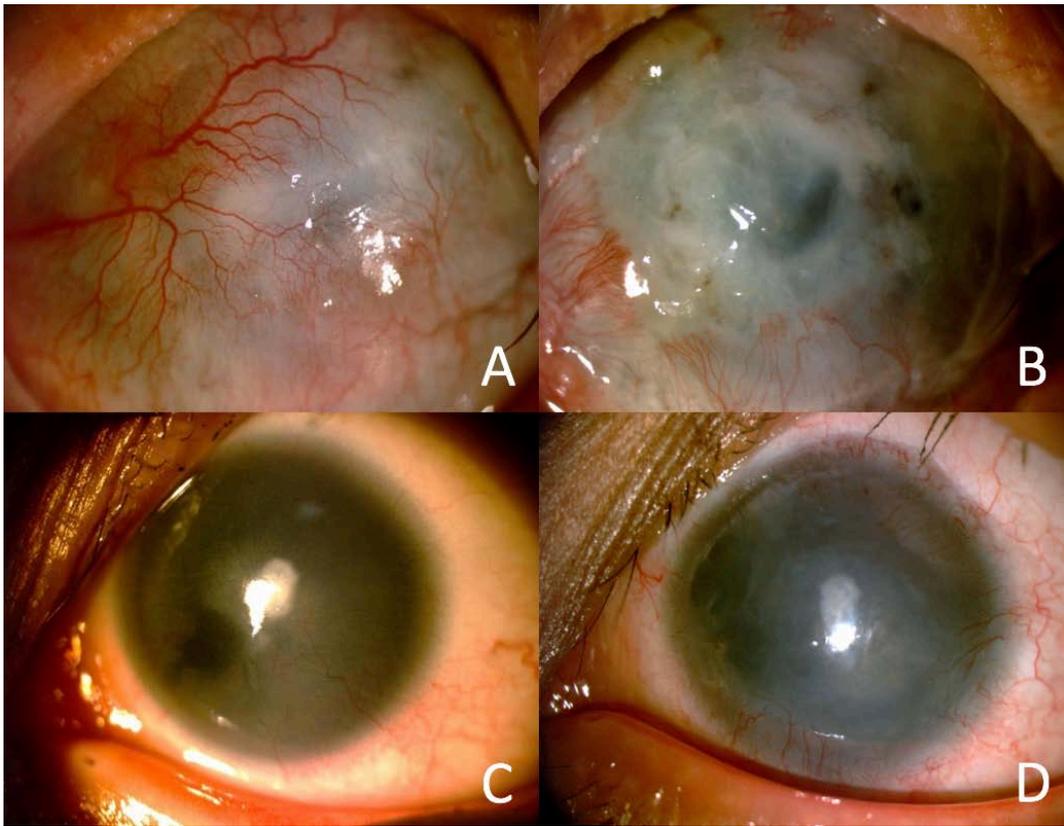


Figura 11: Imágenes comparativas pre y postoperatorias de los pacientes que presentaron mejoría. Línea de arriba muestra imágenes prequirúrgica (A) y postquirúrgica (B) del paciente número 8 con antecedente de quemadura térmica, mostrando mejoría en la superficie ocular, con disminución de los vasos sanguíneos y aclaramiento central de la córnea. Línea de abajo muestra imágenes prequirúrgica (A) y postquirúrgica (B) del paciente número 10 con antecedente de aniridia congénita, mostrando mejoría con disminución de la queratopatía anirídica con la membrana amniótica ya integrada. Imágenes tomadas con lámpara de hendidura.

El paciente 9 (1/10, 10%) se excluyó del seguimiento ya que presentó lisis corneal severo no relacionado con el trasplante de las células epiteliales troncales, 1 mes después de su cirugía (**Figura 12**), presentando perforación corneal extensa y requiriendo de un trasplante esclero-corneal para mantener la integridad ocular.

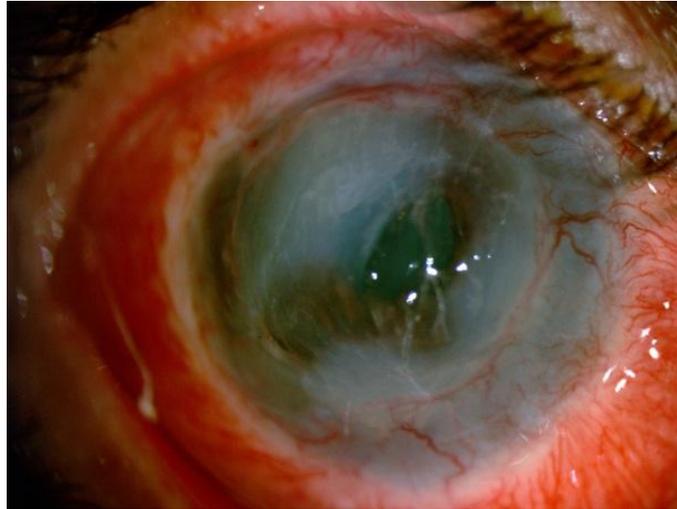


Figura 12: Imagen clínica del paciente 9 con antecedente de quemadura con álcali, presentando lisis corneal severo 1 mes después del implante de células de limbo. Imágenes tomadas con lámpara de hendidura.

La agudeza visual mejor corregida en este momento del seguimiento se mantiene sin cambios, en los pacientes, ya sea por la presencia de falla, o porque en este momento aún no entran a fase de rehabilitación con queratoplastía penetrante.

Las características clínicas post-operatorias detalladas de los pacientes del estudio se mencionan a continuación.

- Paciente 1 (Artritis reumatoide y síndrome de Sjögren; iatrogénica): Episodios de rechazo del injerto manejados con esteroide tópico y sistémico, con evolución a falla.
- Paciente 2 (Dermatitis ampollosa sub-epidérmica; penfigoide ocular): Episodios de rechazo del injerto manejados con esteroide tópico y sistémico, con evolución a falla.
- Paciente 3 (Síndrome de Stevens Johnson): Progresión lenta de la vascularización y nueva conjuntivalización de la superficie ocular.
- Paciente 4 (Panuveítis idiopática): Progresión lenta de la vascularización y nueva conjuntivalización de la superficie ocular.

- Paciente 5 (Quemadura con álcali): Episodios de rechazo del injerto manejados con esteroide tópico y sistémico, con evolución a falla.
- Paciente 6 (Conjuntivitis alérgica de larga evolución): Progresión lenta de la vascularización y nueva conjuntivalización de la superficie ocular.
- Paciente 7 (Quemadura con hidróxido de calcio): Progresión lenta de la vascularización y nueva conjuntivalización de la superficie ocular.
- Paciente 8 (Quemadura térmica): Mejoría en la superficie ocular, con disminución de los vasos sanguíneos y aclaramiento central de la córnea.
- Paciente 9 (Quemadura con álcali): Lisis corneal severa no relacionado con el trasplante de las células troncales 1 mes después de su cirugía.
- Paciente 10 (Aniridia congénita): Mejoría con disminución de la queratopatía anirídica.

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio que evalúa la presencia y expresión del marcador ABCB5 en conjunto con el marcador $\Delta p63$ en el trasplante de células epiteliales de limbo expandidas *in vitro* sobre tejido amniótico para la reconstrucción de la superficie corneal.

Estado preoperatorio

Los pacientes incluidos en este estudio, presentan una muestra heterogénea de etiologías de deficiencia de células de limbo bilateral. A pesar que aproximadamente la mitad de los pacientes presentaron etiologías relacionadas con quemaduras, es importante mencionar que los demás presentan etiologías diversas como síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide ocular cicatrizal, artritis reumatoide, conjuntivitis alérgica de larga evolución, entre otros.

Respecto a los estudios preoperatorios, la concordancia diagnóstica tanto de la citología de impresión y la microscopía confocal *in vivo* se ha reportado alta para los 2 métodos, siendo de hasta el 90% en algunos estudios, pudiendo ambos mostrar la presencia de sólo epitelio corneal (ojos sin deficiencia de células de limbo), sólo epitelio conjuntival

(ojos con deficiencia total de células de limbo), y patrón mixto con epitelio corneal y conjuntival (ojos con deficiencia parcial de células de limbo) (Nubile y cols 2013). En similitud con otros estudios, los pacientes de este protocolo presentaron los hallazgos reportados en citología de impresión y en microscopía confocal *in vivo*, en la primera siendo evidente la combinación de células epiteliales de córnea y conjuntiva junto con la presencia de células caliciformes (Donisi y cols 2003; Sejjal y cols 2013), y la segunda resaltando la presencia de células de epitelio conjuntival con reflectividad superficial, la presencia de células caliciformes como células redondeadas y ovals con alta reflectividad dentro del mosaico epitelial, así como la presencia de colágeno conjuntival estromal denso en la presencia de pannus, además de que el estroma del limbo se reemplazaba por fibrosis homogénea (Chidambaranathan y cols 2015; Nubile y cols 2013).

El cuestionario de calidad de vida de los pacientes en este estudio, pone en evidencia la alteración global que presentan relacionada con la visión. Como menciona Miri y colaboradores, el análisis de la agudeza visual en los pacientes que entran a reconstrucción de la superficie ocular con procedimientos como el trasplante de células de limbo, no es suficiente porque no evalúa de forma integral los problemas que presentan relacionados con una baja visión, además de aquellos problemas ocasionados por malestar crónico; es por ello que el NEI-VFQ-25 modificado permite de forma más adecuada un análisis completo en estos pacientes (Miri y cols 2010).

Citometría de flujo, RT-PCR, inmunohistoquímica.

El análisis de RT-PCR de otros estudios también ha mostrado diferenciación positiva para marcadores de células troncales como $\Delta p63$ y ABCG2, aunque en ocasiones también incluyen el análisis de marcadores de células epiteliales corneales no queratinizadas como CK3, CK12 y CK13 (Prabhasawat y cols 2012). Nuestro estudio hizo énfasis en que la expresión de los 2 marcadores principales que fueron evaluados aquí, ABCB5 y $\Delta p63$, es similar siendo evidente en citometría de flujo y RT-PCR.

En un estudio para investigar las interacciones células epiteliales-estromales, en el que utilizaron un modelo tridimensional para cultivar una población mixta de células epiteliales del limbo con células troncales del estroma corneal, se demostró que ABCB5 se encontraba en una gran proporción en las células epiteliales del limbo basales, después de

13 días de cultivo en un análisis de inmunohistoquímica (**Kureshi y cols 2015**). Asimismo, un estudio realizó la comparación de la expresión de ABCB5 en limbo normal con un estudio de neoplasias escamosas de la superficie ocular, describiendo que ABCB5 se expresa claramente en la capa epitelial basal del limbo sano, sin mostrar expresión en las capas suprabasales (**Jongkhajornpong y cols 2016**). Por otro lado, en los pacientes con neoplasias escamosas de la superficie ocular se observó que ABCB5 se encontraba sobreexpresada, sin confinarse a la capa epitelial basal, apareciendo también en las células suprabasales y superficiales, pudiendo describir 3 patrones específicos: 1) perivascular en los que la mayor expresión de ABCB5 se observó en el área alrededor de las estructuras vasculares, 2) marginal en el que ABCB5 se expresó en el margen basal de los tumores y 3) difuso en el que ABCB5 se encontraba difusamente expresado en todas las capas epiteliales (**Jongkhajornpong y cols 2016**). Un modelo de células formadoras de esferas de la córnea periférica utilizadas para repoblar la superficie ocular en rodetes esclero-corneales humanos también mostró inmunotinción positiva para marcadores de troncalidad $\Delta p63$, ABCG2 y ABCB5 (**Mathan y cols 2016**). Todos estos estudios, en conjunto con el nuestro hacen evidente la importante expresión de ABCB5 en las células troncales específicas del limbo.

Por el tamaño de muestra grande, el grupo de Rama y colaboradores en su estudio con injerto autólogo en pacientes con quemaduras, pudieron observar que los cultivos que contenían más de 3% de p63-brillante llevaban a una regeneración exitosa el epitelio corneal en 78% de los ojos, sólo 8% acaban en falla y 14% regeneración parcial; en contraste los cultivos que tenían 3% o menos de p63-brillante eran exitosos en 11% de los ojos, fallaban el 67% y regeneración parcial en 22%, generando con esto un factor pronóstico en el futuro del trasplante (**Rama y cols 2010**). Esta determinación fue posible por métodos de inmunofluorescencia cuantitativa (**Di Iorio y cols 2006**). En el caso de este estudio, la muestra limitada de pacientes y la tasa elevada de falla no permite hacer un análisis estadístico que determine si ABCB5 también juega un papel pronóstico en la supervivencia de células epiteliales cultivadas.

Resultados postoperatorios

Los resultados clínicos de este estudio muestran una tasa elevada de falla. El epitelio corneal es la estructura más antigénica de todos los tejidos oculares, y aunque la

inmunoreactividad disminuye durante el cultivo celular *in vitro*, la ocurrencia del rechazo inmune se encuentra presente después de todos los tipos de procedimientos de trasplante alogénico en la superficie ocular (**Ang y cols 2013; Qi y cols 2013**). El rechazo inmune también se presenta no sólo en el trasplante de células epiteliales cultivadas, sino también en cualquier otro procedimiento de trasplante de células troncales de la superficie ocular, incluyendo los injertos queratolímbicos y los aloinjertos conjuntivales de donador vivo relacionado (**Ang y cols 2013**). La identificación de un rechazo inmunológico en pacientes con trasplante de células epiteliales cultivadas alogénicas es difícil de reconocer, el cual puede resultar, si no se detecta, a falla del mismo. La presencia de rechazo inmune en estos pacientes, normalmente se manifiesta con un epitelio corneal edematoso con líneas de rechazo epiteliales y defectos epiteliales periféricos, con vasos perilímbicos volviéndose hiperémicos y extendiéndose hasta el estroma corneal, resultando en un agravante de la neovascularización corneal, generando a su vez mayor opacidad del estroma, y que a nivel celular presenta aumento de células T CD4 o CD8 (**Qi y cols 2013**).

La evaluación de los distintos resultados de los estudios de cultivo de células epiteliales del limbo es difícil de comparar, ya que son muchas las etiologías involucradas, los medios de cultivo, abordaje quirúrgico y resultados subjetivos y objetivos (**Haagdorens y cols 2016; Zhao y Ma 2015**).

Un primer factor importante a considerar es el origen de las células utilizadas para cultivarse, pudiendo ser autólogas, de donador vivo relacionado o de donador cadavérico. La presencia de rechazo inmunológico en las distintas series es variable, Miri et al demostraron que los mejores resultados a largo plazo en trasplante de células de limbo se obtienen en autoinjerto, seguido por los de donador vivo relacionado y al último donador cadavérico, en donde 5 de los 6 pacientes trasplantados con este último origen celular mostraron falla a largo plazo (**Miri y cols 2010**). Esto, en contraste con un estudio realizado en Tailandia, en donde encontraron lo contrario, que el éxito clínico fue menor en aquellos pacientes con autoinjerto (66.7%), que en aquellos con aloinjerto (85.7%) utilizando también ciclosporina sistémica como inmunosupresor postoperatorio, pero que en este estudio ellos lo atribuyen a una mayor incidencia de alteraciones de los párpados en el grupo de autoinjerto (**Prabhasawat y cols 2012**). De la misma manera, otros grupos han reportado un éxito de más del 70% en cultivo alogénico para deficiencia bilateral de células

de limbo (**Basu y cols 2012**). Un meta-análisis evaluando los distintos estudios de células cultivadas de células troncales de limbo, no encontró una diferencia significativa en los procedimientos exitosos ni en agudeza visual mejor corregida entre aquellos que reportaban autoinjertos en comparación con aloinjertos (**Zhao y Ma 2015**). Las células tomadas para cultivo de donadores vivos relacionados en vez de donadores cadavéricos, aunque amerita todavía inmunosupresión sistémica del receptor del trasplante, implica la posibilidad de un menor riesgo de rechazo inmunológico quizá por el pareo de HLA (**Miri y cols 2010**). Este procedimiento para el donador vivo relacionado, es una intervención segura, ya que la toma de un injerto de limbo de 2x2 mm con 3x3 mm de conjuntiva adyacente ha mostrado generar sólo síntomas de malestar ocular a no más de 4 semanas del postoperatorio, sin mostrar reducción subjetiva u objetiva de la visión, y con todos los sitios de limbo denudado mostrando re-epitelización dentro de 2 semanas (**Miri y cols 2011**.) Se debe recordar que en nuestro estudio, se tomó la decisión de realizar en todos los pacientes injerto de donador cadavérico, porque todos los casos presentaban deficiencia severa bilateral, y en la gran mayoría de los casos no se contaba con un donador vivo relacionado; esto pudiera explicar en parte la tasa alta de falla que se presentó.

Otro factor importante a considerar es la etiología. En la serie reportada por Qi et al de trasplante alogénico, el rechazo inmune se ha reportado en un 23.8% de los pacientes, aunque cabe destacar que todos los pacientes de la serie reportaban etiologías de quemaduras térmicas o químicas (**Qi y cols 2013**). Los pacientes de nuestro estudio presentan varios de ellos etiologías con base inflamatoria, en donde en ocasiones es difícil diferenciar entre rechazo e inflamación. A diferencia de lo reportado en otro estudio que evalúa el rechazo en injertos queratolímbicos y aloinjertos conjuntivales de donador vivo relacionado, sorpresivamente en estos procedimientos, las etiologías inflamatorias como síndrome de Stevens–Johnson o penfigoide ocular cicatrizal no confirmaron mayor riesgo de rechazo (**Ang y cols 2013**). Incluso, se debe recordar que aunque incluimos pacientes de etiología por quemadura, se ha demostrado que estos pacientes siguen presentando reacción inflamatoria crónica incluso mucho tiempo después del evento inicial (**Ang y cols 2013**).

Los factores entonces que pudieron llevar a nuestros pacientes de un rechazo inicial, a terminar en falla del trasplante, incluyen la referencia o tratamiento tardío de los pacientes y la incapacidad de los pacientes de notar la presencia del rechazo sobre todo en etapas

tempranas, cuando la presencia de ojo rojo, irritación y fotofobia son difícilmente reconocibles por la situación clínica el trasplante, y recordando que la mayor incidencia de rechazo se presenta en los primeros meses (**Qi y cols 2013**).

Dejando un lado las características clínicas preoperatorias de los pacientes, es donde entra a discusión las ventajas y desventajas del cultivo celular en consideración con el nicho de las células troncales. De forma original, las células troncales requieren de un nicho para desarrollarse de forma adecuada, tomando en cuenta que el nicho no sólo representa una estructura anatómica, sino también funcional, que interactúa con señales extrínsecas como factores de crecimiento y citocinas que en conjunto determinan las propiedades y comportamiento de éstas células, llevando al restablecimiento del microambiente en donde de forma inicial se desarrollaban éstas células (**Chen y cols 2013**). Recientemente, se ha demostrado que la baja sobrevivencia de algunas de las células trasplantadas en oftalmología, no sólo depende de las propias células, sino también de todo el microambiente que está involucrado en la sobrevivencia, proliferación e incluso diferenciación reversa (**Wan y cols 2015**). En el caso específico de las células del epitelio corneal, se ha comprobado que las criptas del limbo, localizadas entre las palizadas del estroma del limbo, y por la expresión de diversos marcadores como K14, ABCG2 y p63 en esta zona, se sugiere que son ellas las que otorgan el microambiente (**Dua y cols 2005; Wan y cols 2015**).

Recientemente, se comprobó que la recreación del ambiente nativo *in vitro* usando un modelo de tejido 3D co-cultivando en conjunto células epiteliales de limbo con células troncales del estroma corneal, permitieron una expresión mantenida de marcadores de células limbales como son p63 α , ABCB5, CK8 y CK15, sugiriendo que terapias futuras consistan en cultivo de múltiples tipos celulares para restaurar el nicho del limbo (**Kureshi y cols 2015**). De igual forma, se ha demostrado que un ensayo formador de esferas enriquecidas no sólo con las células madre del limbo, sino también con heterogeneidad de células que imitan la comunicación intercelular del nicho y que al ser implantadas en rodetes corneo-esclerales humanos logran repoblar la superficie ocular (**Mathan y cols 2016**).

Los resultados de los dos pacientes que presentaron mejoría en nuestro estudio, reafirman que dentro de las diversas etiologías de deficiencia bilateral de células de limbo,

los pacientes con quemaduras son de aquellos que pueden presentar más probabilidades de mejoría, y el hallazgo de mejoría en el paciente con aniridia, abre campo a extender el trasplante de células troncales de limbo como terapia para otras patologías que ocasionan deficiencia congénita de células de limbo.

El paciente que presentó la complicación severa posterior al trasplante de células de limbo se considera como un hallazgo poco común al no encontrar en otras series el hallazgo de lisis corneal relacionada con el procedimiento, y siendo en otras series las complicaciones usualmente reportadas las queratitis infecciosas (**Prabhasawat y cols 2012**) y la hemorragia (**Basu y cols 2012; Rama y cols 2010**).

Limitaciones del estudio

Este estudio presenta limitaciones. Se trata de una muestra heterogénea y pequeña de pacientes. Los resultados con una tasa elevada (70%) de falla no permiten realizar un análisis estadístico adecuado para determinar factores pronósticos o hacer correlación con la presencia y expresión de ABCB5. Otra limitación es el hecho de que la agudeza visual final no pudo tomarse en consideración para la evaluación de estos pacientes, debido a que por el corto tiempo de seguimiento, y la baja tasa de éxito, en muchos pacientes no se pudo realizar un procedimiento de rehabilitación como sería una queratoplastia penetrante óptica que es lo ideal (**Prabhasawat y cols 2012; Rama y cols 2010**). Finalmente, el tiempo de seguimiento en los últimos pacientes es corto.

CONCLUSIONES

- ABCB5 y de $\Delta Np63\alpha$ se expresan en cantidad similar en las células epiteliales del limbo expandidas *in vitro* trasplantadas en pacientes con deficiencia bilateral de células troncales del limbo.
- ABCB5 se encuentra de forma predominante en la membrana celular y $\Delta p63$ se localiza en los núcleos celulares en las células epiteliales del limbo expandidas *in vitro*.
- El trasplante de células epiteliales del limbo expandidas *in vitro* alogénicas, expandidas en membrana amniótica es una alternativa de tratamiento en pacientes

con deficiencia bilateral de células de limbo por quemaduras, y en etiologías congénitas como aniridia.

- El trasplante de células epiteliales del limbo expandidas *in vitro* alogénicas, expandidas en membrana amniótica no presenta beneficio en pacientes con deficiencia bilateral de células de limbo por enfermedades inmunológicas.

Sugerencias para futuros proyectos

Este proyecto abre la puerta a distintas posibilidades en la parte de la relación de ABCB5 con el trasplante de células troncales cultivadas *in vitro* para pacientes con deficiencia de células de limbo. Controlando los factores que llevaron a falla a los pacientes, como pueden: ser el evitar etiologías predominantemente inmunológicas, aumentar el tamaño de la muestra y lograr un tratamiento más agresivo y pronto de los episodios de rechazo, se podría hacer una correlación del resultado clínico con la presencia y expresión de ABCB5 en los injertos utilizados. De ser así, pudiera valorarse si ABCB5 debe convertirse en el marcador celular por excelencia para la terapia de cultivo de células troncales de limbo.

Esto también puede extenderse a pacientes con enfermedad unilateral, en donde el crecimiento de células troncales de limbo ABCB5-positivas autólogas tomadas del ojo no afectado, puede permitir la preparación de injertos puros de células troncales de limbo para obtener un número terapéutico adecuado, y en estos casos evitar un rechazo inmunológico. O bien, de forma similar a lo realizado en este trabajo, pero con la purificación de células ABCB5-positivas para el trasplante alogénico en pacientes con deficiencia de células de limbo bilateral, pudiera mejorar los resultados clínicos, al considerarse que estos injertos purificados de células troncales pudieran ser menos inmunogénicos, y mostrar una mayor capacidad de resistencia y evasión del rechazo inmune, comparado con las poblaciones celulares del limbo más diferenciadas, con potencial para requerir menor inmunosupresión y una menos incidencia de rechazo del injerto (**Frank y Frank 2015**).

REFERENCIAS

- *Ang AY, Chan CC, Biber JM, Holland EJ. Ocular surface stem cell transplantation rejection: incidence, characteristics, and outcomes. *Cornea*. 2013;32(3):229-36.
- *Baradaran-Rafii A, Ebrahimi M, Kanavi MR, Taghi-Abadi E, Aghdami N, Eslani M, et al. Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty. *Cornea*. 2010;29(5):502-9.
- *Basu S, Ali H, Sangwan VS. Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(4):643-50, 650.e1-2.
- *Basu S, Fernandez MM, Das S, Gaddipati S, Vemuganti GK, Sangwan VS. Clinical outcomes of xeno-free allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for bilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(12):1504-9.
- *Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem*. 2011;112(4):993-1002.
- *Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*. 2013;140(2):255-65.
- *Chidambaranathan GP, Mathews S, Panigrahi AK, Mascarenhas J, Prajna NV, Muthukkaruppan V. In vivo Confocal Microscopic Analysis of Limbal Stroma in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2015;34(11):1478-86.
- *de Waard NE, Kolovou PE, McGuire SP, Cao J, Frank NY, Frank MH, et al. Expression of Multidrug Resistance Transporter ABCB5 in a Murine Model of Human Conjunctival Melanoma. *Ocul Oncol Pathol*. 2015;1(3):182-189.
- *Di Iorio E, Barbaro V, Ferrari S, Ortolani C, De Luca M, Pellegrini G. Q-FIHC: quantification of fluorescence immunohistochemistry to analyse p63 isoforms and cell cycle phases in human limbal stem cells. *Microsc Res Tech*. 2006;69(12):983-91.
- *Dobrowolski D, Wylegala E, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, Wróblewska-Czajka E. Application of autologous cultivated corneal epithelium for corneal limbal stem cell insufficiency--short-term results. *Klin Oczna*. 2011;113(10-12):346-51.

- *Domínguez-López A, Bautista-de Lucio VM, Serafín-López J, Robles-Sánchez E, Garfias Y. Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs expression and NF- κ B nuclear translocation on limbal myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2014;127:215-23.
- *Donisi PM, Rama P, Fasolo A, Ponzin D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. *Cornea.* 2003;22(6):533-8.
- *Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(5):415-25.
- *Dua HS, Miri A, Alomar T, Yeung AM, Said DG. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. *Ophthalmology.* 2009;116(5):856-63.
- *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(5):529-32.
- *Erie JC, Campbell RJ, Liesegang TJ. Conjunctival and corneal intraepithelial and invasive neoplasia. *Ophthalmology.* 1986;93(2):176-83.
- *Frank MH, Frank NY. Restoring the cornea from limbal stem cells. *Regen Med.* 2015;10(1):1-4.
- *Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, Margaryan A, Shlain D, Doeing C, et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem.* 2003;278(47):47156-65.
- *Garfias Y, Zaga-Clavellina V, Vadillo-Ortega F, Osorio M, Jimenez-Martinez MC. Amniotic membrane is an immunosuppressor of peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Invest.* 2011;40(2):183-96.
- *Haagdorens M, Van Acker SI, Van Gerwen V, Ní Dhubhghaill S, Koppen C, Tassignon MJ, et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9798374.
- *Hatch KM, Dana R. The structure and function of the limbal stem cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency. *Int Ophthalmol Clin.* 2009;49(1):43-52.
- *James SE, Rowe A, Ilari L, Daya S, Martin R. The potential for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea.* 2001;20(5):488-94.

- *Jongkhajornpong P, Nakamura T, Sotozono C, Nagata M, Inatomi T, Kinoshita S. Elevated expression of ABCB5 in ocular surface squamous neoplasia. *Sci Rep.* 2016;6:20541.
- *Kolli S, Lako M, Figueiredo F, Mudhar H, Ahmad S. Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane. *Regen Med.* 2008;3(3):329-42.
- *Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, Saab KR, Guo Q, Ma J, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature.* 2014;511(7509):353-7.
- *Kureshi AK, Dziasko M, Funderburgh JL, Daniels JT. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents. *Sci Rep.* 2015;5:16186.
- *Lim P, Fuchsluger TA, Jurkunas UV. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol.* 2009;24(3):139-48.
- *Lužnik Z, Bertolin M, Breda C, Ferrari B, Barbaro V, Schollmayer P, & Ferrari S. (2016). Preservation of Ocular Epithelial Limbal Stem Cells: The New Frontier in Regenerative Medicine. In *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells* (pp. 179-189). Springer International Publishing.
- *Mathan JJ, Ismail S, McGhee JJ, McGhee CN, Sherwin T. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate the ability to repopulate the ocular surface. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):81.
- *Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants. *Ophthalmology.* 2010;117(6):1207-13.
- *Miri A, Mathew M, Dua HS. Quality of life after limbal transplants. *Ophthalmology.* 2010;117(3):638, 638.e1-3.
- *Miri A, Said DG, Dua HS. Donor site complications in autolimbal and living-related allolimbal transplantation. *Ophthalmology.* 2011;118(7):1265-71.
- *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(10):1280-4.
- *Nubile M, Lanzini M, Miri A, Pocobelli A, Calienno R, Curcio C, et al. In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(2):220-32.

- *O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells*. 2011;29(12):1923-32.
- *Qi X, Xie L, Cheng J, Zhai H, Zhou Q. Characteristics of immune rejection after allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation. *Ophthalmology*. 2013;120(5):931-6.
- *Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3156-61.
- *Pellegrini G, Rama P, De Luca M. Vision from the right stem. *Trends Mol Med*. 2011;17(1):1-7.
- *Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349(9057):990-3.
- *Prabhasawat P, Ekpo P, Uiprasertkul M, Chotikavanich S, Tesavibul N. Efficacy of cultivated corneal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1483-92.
- *Puangsricharn V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 1995;102(10):1476-85.
- *Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001;72(9):1478-85.
- *Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363(2):147-55.
- *Schwartz GS, Holland EJ. Iatrogenic limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 1998;17(1):31-7.
- *Secker GA, Daniels JT. Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem Cell Rev*. 2008;4(3):159-68.
- *Sejpal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2013;20(1):5-10.
- *Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, et al. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology*. 2008;115(11):1989-97.
- *Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective. *Ocul Surf*. 2010;8(2):80-90.

- *Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A*. 2009;75(1):54-66.
- *Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(12):1691-700.
- *Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*. 2000;343(2):86-93.
- *Utheim TP. Limbal epithelial cell therapy: past, present, and future. *Methods Mol Biol*. 2013; 1014:3–43
- *Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009;3(3):281-90.
- *Vazirani J, Mariappan I, Ramamurthy S, Fatima S, Basu S, Sangwan VS. Surgical Management of Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Ocul Surf*. 2016;14(3):350-64.
- *Wan PX, Wang BW, Wang ZC. Importance of the stem cell microenvironment for ophthalmological cell-based therapy. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):448-60.
- *Zhao Y, Ma L. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2015;34(5):592-600.

ANEXO I

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Análisis de los resultados a corto plazo del trasplante alogénico de células troncales expandidas in vitro con fenotipo ABCB5+/p63+ en pacientes con deficiencia bilateral de células de limbo

Investigadores principales: **Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra / Dr. Juan Carlos Serna Ojeda**

Investigadores Asociados: **M en C. Alejandro Navas Pérez / Dr. Enrique Octavio Graue Hernández / Biol. Exp. Mariana Angélica García Mejía.**

Lugar donde se realizará el estudio: Unidad de Investigación y Departamento de Córnea, Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana

Nombre del paciente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

En la actualidad se hace el trasplante de células corneales en muchas partes del mundo con resultados favorables, sin embargo no existen muchos estudios que expliquen a detalle algún marcador que sirva como pronóstico para determinar si el trasplante será o no rechazado en la enfermedad que usted padece.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo determinar si un marcador que se le conoce como ABCB5 tiene valor pronóstico para que el trasplante de células corneales sea eficaz en un período de un año y medio.

3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará un trasplante de células de córnea de un donador cadavérico que crecerán sobre tejido amniótico. Una vez que las células tapicen el tejido amniótico, éste tejido nuevo será transferido a su ojo para que sea capaz de renovar el epitelio de su córnea. Con esto se espera que el nuevo tejido que creció sobre el amnios crezca también sobre su ojo y pueda mejorar la calidad de su superficie ocular. Al respecto, cuando se realice el crecimiento de las células sobre el tejido amniótico se analizará el marcador ABCB5 en esas células, estos resultados se compararán con el comportamiento de su trasplante a lo largo de un año y medio.

4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de las siguientes fases:

La primera fase implica que usted se someta a una cirugía de trasplante de células de córnea que hayan crecido sobre tejido amniótico. Cabe mencionar que para que las células crezcan sobre tejido amniótico es necesario de compuestos de origen animal como el suero fetal bovino. Para evitar infecciones transmisibles del animal al ser humano, estos compuestos se someten a radiación de tipo gamma. Es necesario mencionar que el cultivo de las células de córnea se hace con los más altos estándares de calidad para evitar cualquier contaminación.

La segunda fase es de revisión, esto significa que usted estará siendo revisado cuatro veces. La primera un día después de la cirugía, la segunda revisión será después de seis meses, la tercera a los doce meses y la cuarta a los 18 meses después de la intervención.

Es importante mencionar que los riesgos a los que se somete en este estudio son los que le confiere el realizarse una cirugía, como infecciones y los propios riesgos relacionados a la anestesia.

Los efectos adversos que se esperan de este estudio son poco frecuentes y están relacionados con el posible rechazo que su ojo pudiera generar en contra de las células que se le están trasplantando. Para evitar estos posibles efectos adversos, se le solicitará que durante los primeros seis meses posteriores a su cirugía tome medicamentos que le ayuden a su sistema inmune a aceptar bien las nuevas células que le ayudarán a regenerar su córnea.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario a esta intervención o requiera otro tipo de atención relacionada con este estudio, se le otorgará el tratamiento sin costo alguno para usted.

5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente en otras partes del mundo se ha llevado a cabo el mismo procedimiento y considerando su presentación clínica usted tiene muchas probabilidades de que sus síntomas oculares se mejoren con este estudio, de la misma manera se ha descrito que también repercutirá en su calidad de vida de una manera favorable. Además, este estudio permitirá averiguar si existe un marcador que permita ser pronóstico para que su trasplante sea eficaz y poder así tomar en cuenta ese marcador pronóstico en otras personas que tengan un diagnóstico clínico similar al de usted con la misma intervención quirúrgica.

6.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio

puede comunicarse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212 con la Lic. Edith Romero Chávez

- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio y utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- No recibirá pago por su participación, sin embargo queda claro que tanto la aplicación del tejido amniótico con las células de córnea (aloinjerto), así como los costos de revisión y los exámenes para dar seguimiento a su trasplante serán gratuitos para usted.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la

Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

No. Telefónico

Fecha

*** Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.**

ANEXO II

NEI-VFQ-25 (Modificado por Miri et al., 2010)

Si usa lentes o lentes de contacto, por favor responda a todas las preguntas como si los llevara puestos, con uno o los dos ojos abiertos, como vea mejor.

A2. Actualmente, diría usted que su vista es:

Excelente () Buena () Regular () Mala () Muy Mala () Completa ceguera ()

A3. ¿Qué tan seguido se preocupa acerca de su vista? Diría usted que:

Nunca () Una pequeña parte del tiempo () Parte del tiempo ()

La mayor parte del tiempo () Todo el tiempo ()

A4. ¿Cuánto dolor o malestar diría usted que ha sentido en los ojos o alrededor de los ojos (por ejemplo, ardor, picazón, o dolor)? Diría usted que:

Nada () Un poco () Moderado () Severo () Muy severo ()

A5. ¿Cuánta dificultad tiene usted para leer la letra regular de los periódicos ?

Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A6. ¿Cuánta dificultad tiene para hacer trabajos o pasatiempos/hobbies que requieren que usted vea bien de cerca , como cocinar, coser, arreglar

cosas en la casa, o usar herramientas? Diría usted que:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A7. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para encontrar algo que está en un estante/repisa lleno/a de cosas ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A8. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para leer los nombres de las calles o los nombres de las tiendas ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A9. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para bajar escalones, escaleras, o el borde de la acera/banqueta cuando hay poca luz o es de noche ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A10. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para notar objetos a los lados cuándo va caminando ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A11. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para ver cómo reacciona la gente cuando usted dice algo ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A12. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para escoger y

coordinar su propia ropa ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A13. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para visitar a la gente en su casa, en fiestas o en restaurantes ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A14. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para salir al cine, al teatro, o a ver eventos deportivos ? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A15. Ahora me gustaría hablarle sobre manejar un coche. ¿Maneja usted un coche en la actualidad, al menos de vez en cuando?

SI ()(salte a A14c) NO ()

A15a. ¿Es porque nunca ha manejado un coche/carro, o porque ha dejado de hacerlo ?

Nunca he manejado ()(salte a la A15)

Ya no lo hago ()

A15b. Dejó de manejar principalmente a

causa de su vista, principalmente por otras razones, o por su
vista y otras razones ?

Problemas de la vista () Otras razones () Ambas ()

A15c. Si aún maneja: ¿Cuánta dificultad tiene usted para manejar

durante el día por lugares conocidos? Diría usted que tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad ()

A15d. ¿Cuánta dificultad tiene usted para manejar de noche? Diría usted que

tiene:

Ninguna dificultad () Un poco de dificultad () Moderada dificultad ()

Extrema dificultad () Dejó de hacerlo a causa de su vista ()

Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado en hacer esto ()

A16. ¿Qué tan seguido ha realizado usted menos trabajo del que le hubiera

gustado hacer a causa de su vista?

Todo el tiempo () La mayor parte del tiempo () Parte del tiempo ()

Una pequeña parte del tiempo () Nunca ()

A17. ¿Qué tan seguido está limitado/a en cuanto tiempo puede trabajar o hacer

otras cosas por su vista?

Todo el tiempo () La mayor parte del tiempo () Parte del tiempo ()

Una pequeña parte del tiempo () Nunca ()

A18. ¿Qué tan seguido no puede hacer lo que quisiera a causa del dolor o malestar en los ojos o alrededor de los ojos , por ejemplo ardor, picazón, o dolor? Diría usted que

Todo el tiempo () La mayor parte del tiempo () Parte del tiempo ()
 Una pequeña parte del tiempo () Nunca ()

A19. Me quedo en casa la mayor parte del tiempo a causa de mi vista. Diría usted que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()
 Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A20. Me siento frustrado/a gran parte del tiempo a causa de mi vista. Diría usted que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()
 Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A21. Tengo mucho menos control sobre lo que hago a causa de mi vista. Diría usted que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()
 Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A22. A causa de mi vista, tengo que depender demasiado en lo que otra gente me dice . Diría usted que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()
 Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A23. Necesito mucha ayuda de otras personas a causa de mi vista. Diría usted

que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()

Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A24. Me preocupa que voy a hacer cosas que me van a causar vergüenza a mi

mismo/a o a otros a causa de mi vista. Diría usted que es:

Definitivamente cierta () Mayormente cierta() No está seguro/a ()

Mayormente falsa () Definitivamente falsa ()

A25. ¿Qué tanta dificultad tiene usted de ir solo(a) al baño?

Sin dificultad () Poca dificultad () Moderada dificultad () Mucha
dificultad ()

A26. ¿Qué tanta dificultad tiene usted al caminar solo(a) por la calle?

Sin dificultad () Poca dificultad () Moderada dificultad () Mucha
dificultad ()

A27. ¿Necesita usted de perro guía, acompañante o bastón?

Nunca () Pocas veces () Algunas veces () Muchas veces () Siempre ()

A28. ¿Le preocupa la apariencia de sus ojos?

Nunca () Pocas veces () Algunas veces () Muchas veces () Siempre ()

A29. ¿Le preocupa la reacción de los demás a la apariencia de sus ojos?

Nunca () Pocas veces () Algunas veces () Muchas veces () Siempre ()