



# Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Facultad de Odontología  
Instituto de Oftalmología F.A.P, Conde de Valenciana, I.A.P.  
Ciencias Odontológicas Básicas, Biología Bucal

## **Generación de Injerto Corneal a Partir de Células Troncales Derivadas de la Lámina Propia de la Mucosa Bucal Cultivadas Sobre Membrana Amniótica**

Tesis

Que para optar por el grado de:  
Doctor en Ciencias  
Presenta:

**Sonia López Letayf**

Tutores:

**Dr. Higinio Arzate**

(Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, DEPEI, FO, UNAM)

**Dr. Yonathan Omar Garfías Becerra**

(Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM)

Comité Tutor:

**Dr. Alejandro Navas Pérez**

(Jefe del Area de Enseñanza Médica, Instituto de Oftalmología F.A.P, Conde de Valenciana, I.A.P.)

Ciudad Universitaria, CD. MX., Octubre 2021



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.

# Agradecimientos

Al Dr. Higinio Arzate y al Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra, por permitirme formar parte de sus equipos de trabajo, sus enseñanzas y su apoyo durante todo mi Doctorado. Por sus consejos que me han enriquecido de forma personal y profesional.

Al Dr. Alejandro Navas Pérez, por formar parte de mi comité tutor, y ayudarme a través de mis semestres a mejorar mi trabajo de investigación.

A mi jurado de examen de candidatura: Dr. Alejandro Navas Pérez, Dra. Argelia Almaguer Flores, Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis, Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dr. Ángel Nava Castañeda por evaluar mi desempeño y guiarme hacia el siguiente paso de mi desarrollo.

A mi jurado de examen de grado: Dr. Higinio Arzate, Dra. Argelia Almaguer Flores, Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dr. Ángel Nava Castañeda, por darme un poco de su tiempo para evaluar mi trabajo.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados: Lía, Claudia, Rita, Quique, Mika, Gonzalo, Rita y Mary Chuy (QEPD); por su apoyo, paciencia, enseñanzas, consejos y amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana: Sofi, Betty, Joserra, Mariana, Lalo, Gibran, Emilio e Ilse; por su apoyo, paciencia, enseñanzas, consejos y amistad.

A mi familia y amigos que siempre han estado a mi lado, me han apoyado en todas mis aventuras y me han dado siempre su cariño.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para poder realizar mis estudios de doctorado.

# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>1</b>
<b>Tablas</b> .....	<b>3</b>
<b>Figuras</b> .....	<b>3</b>
<b>Abreviaciones</b> .....	<b>6</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>13</b>
Células troncales.....	13
Células troncales adultas.....	14
Células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal .....	15
Córnea.....	17
Deficiencia de células troncales del limbo. LESCD.....	18
Membrana amniótica.....	20
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>21</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>22</b>
<b>Hipótesis:</b> .....	<b>23</b>
<b>Objetivo general:</b> .....	<b>23</b>
<b>Objetivos específicos:</b> .....	<b>23</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>24</b>
Medios Cultivo Celular .....	24
Obtención de la mucosa bucal:.....	25



<b>Obtención de hOMSC.....</b>	<b>25</b>
<b>Obtención de Células epiteliales del Limbo (LEC).....</b>	<b>25</b>
<b>Caracterización Celular.....</b>	<b>26</b>
Viabilidad. ....	26
Proliferación Celular.....	26
Inmunocitofluorescencia .....	26
Citometría de Flujo.....	27
<b>Diferenciación Celular Fenotipos Mesenquimales .....</b>	<b>28</b>
Osteogénico. ....	28
Condrogénico.....	28
Adipogénico. ....	28
RT-PCR.....	28
<b>Diferenciación Celular Epitelial .....</b>	<b>29</b>
<b>Análisis Histológico e Inmunofluorescencia.....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>30</b>
<b><i>Resultados .....</i></b>	<b><i>31</i></b>
<b>Obtención de hOMSC.....</b>	<b>31</b>
<b>Caracterización Celular hOMSC.....</b>	<b>32</b>
Conteo y Proliferación.....	32
Diferenciación Mesenquimal. ....	32
Citometría de flujo .....	34
Inmunofluorescencia. ....	34
<b>Diferenciación Epitelial .....</b>	<b>36</b>
Cultivo celular sobre membrana amniótica .....	36
Análisis histológico.....	36
Inmunofluorescencia. ....	37
<b><i>Discusión.....</i></b>	<b><i>40</i></b>
<b><i>Conclusiones.....</i></b>	<b><i>43</i></b>
<b><i>Perspectivas .....</i></b>	<b><i>43</i></b>

<b>Artículo .....</b>	<b>45</b>
<b>Referencias, Citas y Bibliografía.....</b>	<b>46</b>

## Tablas

TABLA 1 DIFERENCIAS EN LAS CÉLULAS TRONCALES POR SITIO DE OBTENCIÓN.....	16
TABLA 2 SECUENCIAS PARA RT-QPCR .....	29

## Figuras

FIGURA 1 ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES. DEPENDIENDO DEL MOMENTO EN EL CUAL SE AÍSLAN LAS CÉLULAS TRONCALES SE CLASIFICAN EN EMBRIONALES CUANDO SON AISLADAS DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA EL ESTADIO DE BLASTOCISTO O ADULTAS CUANDO SE AÍSLAN DESDE EL NACIMIENTO HASTA LA EDAD ADULTA. DEPENDIENDO DE SU CAPACIDAD DEFORMAR TEJIDOS TANTO IN VITRO O IN VIVO, SE CLASIFICAN EN TOTIPOTENCIALES SI PUEDEN FORMAR TODOS LOS TEJIDOS EMBRIONARIOS Y EXTRAEMBRIÓNICOS, PLURIPOTENCIALES CUANDO FORMAN TEJIDOS QUE DERIVEN DE LAS TRES CAPAS GERMINALES, MULTIPOTENTES CUANDO FORMAN DISTINTOS TEJIDOS DE UNA CAPA GERMINAL O DE DOS CAPAS GERMINALES Y UNIPOTENTES CUANDO FORMAN UN SOLO TEJIDO A PARTIR DE CÉLULAS CON DIVISIÓN SIMÉTRICA Y ASIMÉTRICA. (31, 32). CREADO CON BIORENDER. ....	13
FIGURA 2 SITIOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EN LA CAVIDAD BUCAL. LA BOCA ES UN SITIO PRIVILEGIADO PARA EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES, YA QUE SE PUEDEN AISLAR DE LA MAYORÍA DE SUS ESTRUCTURAS DE MANERA SENCILLA (5). CREADO EN GIMP. ....	15
FIGURA 3 LOCALIZACIÓN DE LAS HOMSC EN LA MUCOSA BUCAL. LA MUCOSA BUCAL ESTÁ COMPUESTA POR UN EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO PARA QUERATINIZADO QUE RECUBRE A LA LÁMINA PROPIA, LA CUAL ESTA ABUNDANTEMENTE VASCULARIZADA, Y ES ALREDEDOR DE ESTOS VASOS SANGUÍNEOS QUE SE LOCALIZAN A LAS HOMSC. FIGURA PROPIA. ....	17
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE LA CórNEA. LA CórNEA ES UNA ESTRUCTURA MUY ORGANIZADA, LA CUAL SIRVE PARA MANTENER SU TRANSPARENCIA, SU EPITELIO (QUE ES UN EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO NO QUERATINIZADO), ES MANTENIDO A TRAVÉS DE CÉLULAS TRONCALES UBICADAS EN EL LIMBO, LA PRESENCIA DE ESTAS EN CONJUNTO CON LA ESTRUCTURA PARTICULAR DEL LIMBO, EVITAN QUE TANTO VASOS SANGUÍNEOS COMO LA CONJUNTIVA LO INVADAN. FIGURA PROPIA.....	18
FIGURA 5 DEFICIENCIA DE CÉLULAS DEL LIMBO. LA PÉRDIDA DE LAS LESC, LA CUAL SE PUEDE DAR POR ENFERMEDADES O TRAUMATISMOS, ROMPE EL EQUILIBRIO QUE MANTIENE LA ESTRUCTURA DEL LIMBO, LO QUE TIENE COMO CONSECUENCIA QUE TANTO LA CONJUNTIVA COMO VASOS SANGUÍNEOS INVADAN EL ESPACIO CORNEAL, PROVOCANDO PÉRDIDA DE LA VISIÓN. FIGURA PROPIA.....	19
FIGURA 6 MEMBRANA AMNIÓTICA. FORMA LA PARTE DE LA PLACENTA, Y SU ESTRUCTURA ES SENCILLA, ESTÁ FORMADA POR UN EPITELIO CÚBICO SIMPLE, UNA MEMBRANA BASAL Y UN ESTROMA, EL CUAL ES AVASCULAR, MUY PARECIDO AL ESTROMA DE LA CórNEA. ....	20
FIGURA 7 OBTENCIÓN DE HOMSC. EXPLANTE DE MUCOSA BUCAL, LAS CÉLULAS SE OBSERVAN MIGRANDO HACIA AFUERA DEL TEJIDO CULTIVADO (A), CULTIVO A 90-100% DE CONFLUENCIA CON CÉLULAS AGRUPADAS EN CORRIENTES (LÍNEAS ROJAS) Y FORMANDO PATRONES ESTORIFORME (LÍNEAS AMARILLAS) (B). CÉLULAS MOSTRANDO UN NÚCLEO CENTRAL CON NUCLEOLO PROMINENTE (FLECHA	

AMARILLA) CÉLULA EN MITOSIS (PUNTO AMARILLO) (C). CULTIVO DE CÉLULA ÚNICA AL DÍA 1 (D). COLONIA DE CÉLULAS MOSTRANDO UN FENOTIPO MORFOLÓGICO HOMOGÉNEO (E).....	31
<b>FIGURA 8 VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR. COMPARACIÓN DE HOMSC ENTRE LOS DOS GRUPOS DE EDAD. VIABILIDAD PARA AMBOS GRUPOS FUE SUPERIOR AL 90% Y NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (A). EN EL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN SE OBSERVA UNA PEQUEÑA DIFERENCIA ENTRE GRUPOS EN EL DÍA 1, PERO AL DÍA 3 AMBOS GRUPOS PRESENTARON EL MISMO NIVEL DE PROLIFERACIÓN (B). LAS BARRAS REPRESENTAN MEDIA±SE, N=3 POR GRUPO).....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 9 COMPARACIÓN EN LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN ENTRE GRUPOS DE EDAD. FENOTIPO OSTEOGÉNICO, AMBOS GRUPOS DE EDAD MOSTRARON UN INCREMENTO DE <i>OSX</i>, UN MARCADOR DE OSTEÓBLASTOS, ASÍ COMO PRESENCIA DE DEPÓSITOS DE CALCIO DEMOSTRADOS POR LA TINCIÓN DE ALIZARINA ROJA (A). FENOTIPO CONDROGÉNICO. AMBOS GRUPOS DE EDAD MOSTRARON INCREMENTO DE <i>SOX9</i>, UN MARCADOR DE CONDROCITOS, ASÍ COMO PRESENCIA DE MATRIZ EXTRACELULAR CON PRESENCIA DE POLISACÁRIDOS DEMOSTRADOS POR LA TINCIÓN POSITIVA CON AZUL ALCIANO (B). FENOTIPO ADIPOGÉNICO, AUNQUE NO SE OBSERVÓ INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE <i>PPAR<math>\gamma</math></i>, SE OBSERVARON VESÍCULAS POSITIVAS A ROJO OLEOSO QUE INDICA LA PRESENCIA DE LÍPIDOS (C). BARRAS REPRESENTAN MEDIA±SEM, N=3 POR GRUPO). .....</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 10 CARACTERIZACIÓN CELULAR DE HOMSC. A-D) INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES DE MSC Y PLURIPOTENCIA, LAS FLECHAS BLANCAS MARCAN LAS ÁREAS DE POSITIVIDAD. E) GATES PARA LA CITOMETRÍA DE FLUJO. PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS EN EL CULTIVO DE HOMSC, MARCADORES DE MSC: F) CD90 65.8%, G CD73 55.9% H) CD105 15.4% MARCADORES DE PLURIPOTENCIA: I) NANOG 26.8%, J) Sox2 11.5% AND K) Oct3/4, 24.3%.....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 11 CULTIVO E HISTOLOGÍA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA. LA COMPARACIÓN ENTRE LAS TRES CONDICIONES DURANTE EL PERIODO DE CULTIVO Y LA TINCIÓN DE H&amp;E MOSTRARON DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS. EL CULTIVO CON MEDIO MANTENIMIENTO MANTUVO SU FENOTIPO FIBROBLASTOIDE CON NÚCLEOS PROMINENTES (FLECHAS NEGRAS), PERO CON ESCASO CITOPLASMA (AM+HOMSC+DMEM/F12). LAS LEC, QUE SE UTILIZARON COMO EL CONTROL EPITELIAL, EXHIBIERON LAS CARACTERÍSTICAS EPITELIALES HABITUALES, ERAN PEQUEÑAS, POLIGONALES CON UN NÚCLEO CENTRAL Y CON UNA RELACIÓN 1:1 NÚCLEO CITOPLASMA (AM+LEC). EL GRUPO EXPERIMENTAL MOSTRÓ UN ASPECTO FIBROBLASTOIDE CON NÚCLEO PROMINENTE (FLECHAS NEGRAS), SIN EMBARGO, SE ORGANIZARON EN PALIZADAS Y MOSTRARON INCREMENTO EN LA RELACIÓN NÚCLEO CITOPLASMA OBSERVADO EN LA TINCIÓN CON H&amp;E (AM+HOMSC+SHEM).....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 12 INMUNOFLUORESCENCIA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL HOMSC. LOS GRUPOS SHEM Y DMEM PRESENTARON POSITIVIDAD A CK3 EN EL CITOPLASMA. LA CK19 EN ESTUVO PRESENTE EN AMBOS GRUPOS, PERO EN BAJA EXPRESIÓN EN EL CITOPLASMA. LA E-CADHERINA ESTUVO PRESENTE EN AMBOS GRUPOS, PERO SE ENCONTRÓ EN CITOPLASMA CUANDO DEBERÍA OBSERVARSE EN LA MEMBRANA, LA DIFERENCIA MÁS IMPORTANTE ES QUE SE ENCONTRÓ DIFUSA EN EL GRUPO DMEM Y LOCALIZADA FOCALMENTE EN EL GRUPO SHEM. LAS HOMSC CULTIVADAS CON SHEM EXPRESARON CK12 Y PAN-CADHERINA. LAS FLECHAS BLANCAS MARCAN LAS ZONAS DE POSITIVIDAD.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 13 INMUNOFLUORESCENCIA DE LA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL SOBRE MEMBRAN AMNIÓTICA. LA CK3 SE ENCONTRÓ MUY EXPRESADA EN TODOS LOS GRUPOS. LA CK12 ESTUVO COMPLETAMENTE AUSENTE DEL GRUPO DMEM/F12, Y AUNQUE EL GRUPO SHEM EXPRESÓ EL MARCADOR FUE EN MENOR CANTIDAD QUE EL GRUPO LEC. LA CK19 ESTUVO EXPRESADA EN TODOS LOS GRUPOS, PERO COMPARADA CON EL GRUPO LEC, LA EXPRESIÓN DE DMEM/F12 ERA MUCHO MENOR QUE LA DE SHEM. PAN-CADHERINA ESTUVO</b>	

AUSENTE DEL GRUPO DMEM/F12, Y A PESAR DE QUE ESTUVO EXPRESADA EN SHERM ERA MUY POCO Y EN POCAS CÉLULAS. LA E-CADHERINA ESTUVO EXPRESADA EN TODOS LOS GRUPOS, DE MANERA DIFUSA EN DMEM/F12 Y SHERM TENÍA UNA EXPRESIÓN MUY MODESTA EN ALGUNAS CÉLULAS Y LOCALIZADA PRINCIPALMENTE ALREDEDOR DEL NÚCLEO. ....39

## Abreviaciones

MSC	Células troncales mesenquimales
NC	Cresta neural
hOMSC	Human oral mucosa stem cells
MA	Membrana Amniótica
LESC	Limbal epithelial stem cells
LESCD	Limbal epithelial stem cells deficiency
RT-qPCR	Reverse transcriptase – real time polymerase chain reaction
LEC	Limbal epithelial cells
SHEM	Supplemental hormonal epithelium medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle medium/Ham 12 medium
ESC	Células troncales embrionarias
MEM	Minimum essential medium
FBS	Fetal bovine serum
hEGF	Human epidermal growth factor
DMSO	Dymethylsulfoxide
PBS	Phosphate buffered saline.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PBST	PBS + 0.1% Tween 20
BSA	Bovine serum albumin
PC	Polycarbonate

## Resumen

Las células troncales derivadas de la mucosa bucal (hOMSC), surgen de la cresta neural, tienen la capacidad de renovarse, proliferar y diferenciarse en diversas líneas celulares, y son una buena opción celular para usarse en ingeniería de tejidos. Debido a su localización anatómica, son fáciles de aislar, además de que presentan diferenciación multilínea, y expresan marcadores embrionarios como Sox2, Nanog, y OCT3/4. En este estudio, utilizamos SHEM (medio hormonal epitelial suplementado) y el cultivo de hOMSC sobre membrana amniótica, para determinar la capacidad de las células para diferenciarse a epitelio, y expresar marcadores epiteliales como CK3, CK12, CK19, Pan-cadherina and E-cadherina. Nuestros resultados muestran que las hOMSC adheridas a membrana amniótica expresan CK3, CK19, Pan-Cadherina y E-Cadherina, sin la inducción de SHEM y expresan CK12 o cambian su patrón de expresión de E-Cadherina cuando son inducidas con SHEM. Demuestran que las hOMSC tienen la capacidad para diferenciarse a epitelio. En conclusión, las hOMSC, expresan marcadores epiteliales de determinación corneal, y podrían ser una alternativa para tratamientos en oftalmología.

*Palabras clave:* Células troncales, córnea, diferenciación epitelial, mucosa bucal

# Abstract

Human oral mucosa stem cells (hOMSC) arise from neural crest, they can self-renew, proliferate, and differentiate to several cell lines and could represent a good source for application in tissue engineering. Because of their anatomical location hOMSC are easy to isolate, have multilineage differentiation capacity and express embryonic stem cells markers such as: Sox2, Oct3/4 and Nanog. In this study we used SHEM (supplemented hormonal epithelial medium) media and cultured hOMSC over human amniotic membrane and determined the cell's capacity to differentiate to an epithelial-like phenotype and to express corneal specific epithelial markers: CK3, CK12, CK19, Pan-cadherin and E-cadherin. Our results showed that hOMSC possess the capacity to attach to the amniotic membrane and express CK3, CK19, Pan-Cadherin and E-Cadherin without induction with SHEM media and expressed CK12 or changed the expression pattern of E-Cadherin to a punctual-like feature when treated with SHEM media. The results observed in this study, show that hOMSC possess the potential to differentiate toward epithelial cells. In conclusion, our results revealed that hOMSC readily express markers for corneal determination and could provide to the Ophthalmology field a therapeutic alternative for tissue engineering to achieve corneal replacement when compared with other techniques.

*Keywords:* stem cells; cornea; epithelial differentiation; oral mucosa

# Introducción

Las células troncales tienen la capacidad de replicarse y dar origen a células diferenciadas. Poseen tres características: 1) Autorrenovación; 2) Capacidad de proliferación; y 3) Capacidad para diferenciarse en distintos linajes celulares (1). Las células troncales mesenquimales (MSC por sus siglas inglés) son una fracción de los tejidos adultos que se pueden diferenciar in vitro en adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Aunque su perfil inmunológico varía dependiendo del tejido del que fueron aisladas se considera que deben poseer los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y carecer de marcadores hematopoyéticos y endoteliales como CD31, CD34 y CD45 (2, 3), estos marcadores se seleccionaron debido a que las MSC se aislaron de manera inicial de la médula ósea, y se debían diferenciar de las células troncales hematopoyéticas, este perfil también las ubica en un nicho perivascular (3).

Cabeza y cuello y las células derivadas de tejidos de esta región, merecen una mención especial; la formación de los tejidos en estas regiones contienen una gran cantidad de células derivadas de la cresta neural (CN), este tejido es una estructura pluripotente, y sus células aun cuando son derivadas de tejidos adultos, tienen la capacidad de formar tanto tejidos de los sitios donde fueron aisladas como tejidos de otras regiones (4). En cabeza y cuello se encuentra una región que es fácilmente accesible y de la cual se han logrado obtener distintos tipos de células troncales: la boca; los diferentes sitios de donde se pueden obtener incluyen: médula ósea, pulpa dental de dientes permanentes, pulpa de dientes deciduos, folículo dental, germen dental, papila apical, mucosa bucal, periostio, ligamento periodontal, glándulas salivales y tejidos adiposo (5, 6).

La mucosa bucal representa un sitio privilegiado dentro de la boca, tiene una gran capacidad de regeneración y envejece en menor proporción que otros tejidos del cuerpo, tanto el epitelio como la lámina propia contienen células que se pueden utilizar en distintas terapias (7). La lámina propia contiene una población de células troncales con gran potencial de diferenciación denominadas: células troncales de la mucosa bucal



(hOMSC por sus siglas en ingles); estas células expresan marcadores de células troncales embrionarias Tra2-49, Tra2-54, SSEA4, Oct4, Sox2, Nanog y Nestina y, de MSC: CD29, CD73, CD90, CD105 y CD166. Se ha logrado obtener *in vitro* tejidos de las tres capas embrionarias e *in vivo* tumores mixtos derivados del mesodermo y ectodermo (8). Estas células se han logrado diferenciar hacia varios linajes provenientes de CN como células astrocíticas, neuronas dopaminérgicas, cardiomiocitos y osteoblastos (9-12).

Las hOMSC, y otras MSC han sido estudiadas para evaluar su capacidad inmunomoduladora, así como se ha descrito en otras MSC su actividad es principalmente a través de la regulación de células T CD4+, a través de la inhibición de su proliferación, así como la activación de células T reguladoras (5, 13). Un punto importante para poder establecer el alcance de sus aplicaciones en la regulación del sistema inmune fue analizar también marcadores de membrana relacionados con el reconocimiento celular; en este contexto, expresan HLA-A, -B y -C lo que limita su uso a aplicaciones alogénicas, sin embargo se ha observado que pueden controlar al sistema inmune de manera dosis dependiente, a pesar de que pueden llegar a expresar HLA-DR después de su inducción con interferón, no causan reacciones al no presentar los marcadores CD80, CD86, CD156, CD178, y CD40 que se requieren, para el reconocimiento a través de este receptor (12, 14).

Las células troncales, utilizadas como una herramienta en la ingeniería de tejidos, nos ofrece una oportunidad para realizar trasplantes, los cuales al provenir del mismo paciente (autólogos) tendrán menor riesgo de ser rechazados.

Una especialidad en dónde se requiere el uso de ingeniería de tejidos dado su impacto en la calidad de vida de los pacientes es la oftalmología. Actualmente, en México, el trasplante de córnea es uno de los más solicitados. Sin embargo, la cantidad de tejido disponible es limitada y en el boletín informativo del Centro Nacional Trasplantes se menciona que de 22,602 pacientes en lista de espera el 5424(24%) son de córnea, lo que lo hace el segundo tejido más solicitado. El 54.2% de los trasplantes en México fueron de córnea, es el tejido más trasplantando en el país, a pesar de esto, la lista de espera sigue siendo larga para este tipo de trasplante (15).

La córnea es un tejido transparente y avascular, conformado por tres capas celulares (epitelio externo, estroma y endotelio) y dos acelulares (membrana de Bowman y membrana Descemet). En la periferia se une a la esclera a través del limbo; es en este sitio donde se encuentran las células troncales queratolímbicas (LESC por sus siglas en inglés), las cuales se encargan de renovar el epitelio de la córnea (16, 17). Ante la ausencia total de LESC, el epitelio conjuntival vascularizado invade la córnea, dicha condición es llamada deficiencia de células troncales queratolímbicas (LESCD por sus siglas en inglés), la cual conlleva vascularización y opacidad corneal y disminución de la agudeza visual. Las causas de LESCD pueden dividirse en cuatro grupos: 1) deficiencias congénitas (como aniridia, esclerocórnea); 2) enfermedades con causas externas o trauma (quemaduras químicas, térmicas); 3) enfermedades con involucro interno (como síndrome de Stevens-Johnson o penfigoide ocular cicatrizal) y finalmente 4) idiopáticas (18). El trasplante de limbo autólogo puede reparar la córnea, pero conlleva un riesgo importante: dañar al ojo sano; además que esta opción es solo para aquellos pacientes que presentan deficiencia unilateral. Otra opción es el trasplante alogénico, el cuál presenta sus propias complicaciones, entre ellas, la escasez de donadores y el rechazo (19-21).

La idea de utilizar células troncales mesenquimales para reemplazar a las células troncales queratolímbicas, ya ha sido planteada. La principal limitante es que la mayoría de éstas provienen del mesodermo, lo que hace su transdiferenciación hacia epitelio complicada. Sin embargo, se ha visto que si se obtienen de tejidos mesenquimales cuyo origen es la CN (el cual es una especialización del ectodermo con capacidad de transdiferenciación epitelio-mesénquima, durante la embriogénesis), éstas tendrán características que favorecerán la transdiferenciación hacia epitelio. Por ejemplo, células positivas SSEA-4(22), que es un marcador de células troncales embrionarias, presentan mayor expresión de marcadores relacionados a pluripotencia como Sox2, Oct4 y Nanog y por la tanto un mayor potencial para transdiferenciarse a linajes del ectodermo o endodermo(23, 24).

Para facilitar la manipulación del tejido epitelial, se requiere de una matriz que le dé estructura al injerto, la membrana amniótica ya ha sido utilizada con éxito en el

tratamiento de alteraciones en córnea y como sustrato para el cultivo de células queratolímicas con éxito, porque facilita la migración de las células epiteliales en su superficie y ventajas sobre otros andamios como biocompatibilidad, capacidad anti-angiogénica, antibiótica y anti- inflamatoria (25):(26).

# Marco Teórico

## Células troncales

El concepto de célula troncal se originó en Alemania en 1868 para describir la teoría del origen de todos los seres vivos en un ancestro común. Posteriormente en 1898 se utilizó para describir a la célula da origen al sistema hematopoyético (27). El término evolucionó para describir la capacidad de algunos para regenerarse (28). En la actualidad el término se utiliza para describir a una población de células que presentan capacidades de: 1) autorrenovación, que se define como una célula capaz de generar células hijas idénticas a ella sin transformación oncogénica o senescencia; 2) potencia, que se define como capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares; y 3) clonalidad, que es la capacidad de formar cultivos *in vitro* a partir de una sola célula (29).

Se clasifican de acuerdo con su tejido de origen y a su capacidad de diferenciación. (Figura 1)(30).

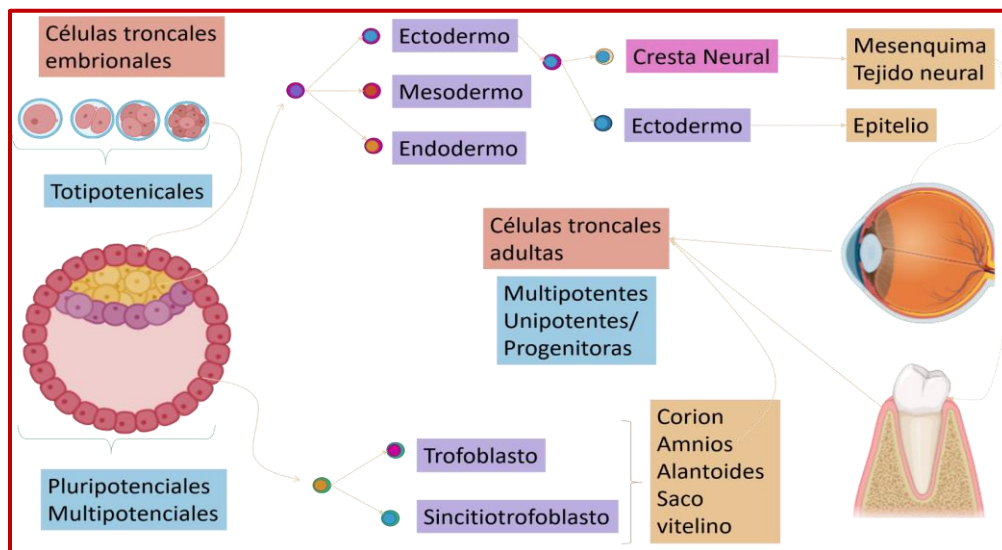


Figura 1 Origen y clasificación de las células troncales. Dependiendo del momento en el cual se aíslan las células troncales se clasifican en embrionales cuando son aisladas desde la fecundación hasta el estadio de blastocisto o adultas cuando se aíslan desde el nacimiento hasta la edad adulta. Dependiendo de su capacidad de formar tejidos tanto *in vitro* o *in vivo*, se clasifican en totipotenciales si pueden formar todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios, pluripotenciales cuando forman tejidos que deriven de las tres capas germinales, multipotentes cuando forman distintos tejidos de una capa germinal o de dos capas germinales y unipotentes cuando forman un solo tejido a partir de células con división simétrica y asimétrica. (31, 32). Creado con Biorender.

El origen de las células troncales depende del periodo de la vida en el que fueron aisladas. Las células troncales embrionarias (ESC por sus siglas en inglés) tienen su origen en la masa interna del blastocisto, el cual tiene la capacidad de formar las tres capas embrionarias que formaran a un individuo y se les considera el equivalente *in vitro* del epiblasto. En cambio el origen de las células troncales adultas, también llamadas mesenquimales (MSC), no es claro y en muchos casos es controversial, se cree que se originan previo al desarrollo de las capas embrionarias, y su falta de compromiso a un tejido específico es lo que da origen a las células multipotentes que se pueden aislar de tejidos adultos, sin embargo la diferencia entre células aisladas de distintos tejidos indica que puedan generarse mucho después a partir de una línea celular somática (28, 29).

### *Células troncales adultas*

Estas células son parte de los tejidos adultos y son importantes para su autorrenovación y reparación. Teóricamente se pueden aislar de cualquier tejido del cuerpo; sin embargo, hay sitios cuyo acceso es más difícil o imposible. Usualmente se encuentran en estos tejidos en pocas cantidades y están localizadas en sitios definidos como nichos, usualmente en tejidos mesenquimales, como el tejido conectivo de soporte de varios órganos, por lo que se les conoce como MSC (5). Estas células se obtienen principalmente por su adherencia al plástico y son caracterizadas posteriormente para: 1) confirmar la ausencia de marcadores de diferenciación hematopoyética como CD31, CD34 y CD45 y corroborar la presencia de marcadores específicos de células troncales mesenquimales como CD73, CD90 y CD105; y 2) confirmar su diferenciación a tejidos mesenquimales (óseo, cartilaginoso y adiposo) (2, 31). A pesar de que estas características todavía se utilizan para definir una población como MSC, CD73, CD90 y CD105 marcan poblaciones en localizaciones perivasculares que es donde se piensa se encuentran los nichos en el tejido conjuntivo (3), se acepta que las células de tejidos aislados en sitios diferentes a médula ósea tengan otros marcadores que las definan como células troncales. Este es el caso de células derivadas de tejidos mesenquimales que derivan en parte de la cresta neural, como los tejidos de cabeza y cuello(32).

## Células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal

La cavidad bucal, al estar localizada en la cabeza es un sitio privilegiado, no solo contiene estructuras cuyo origen embrionario es mixto, contiene células derivadas de la cresta neural y del mesodermo, también es un sitio sencillo de acceder para el aislamiento de células troncales, las cuales se han logrado aislar de las siguientes estructuras de la boca: médula ósea, pulpa dental de dientes permanentes, pulpa de dientes deciduos, folículo dental, germen dental, papila apical, mucosa bucal, periostio, ligamento periodontal, glándulas salivales y tejidos adiposo(5, 33)(Figura 2). Al igual que el resto de los tejidos, dependiendo de su sitio de aislamiento presentan distintos marcadores y capacidad de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo* (resumidos en la tabla 1)

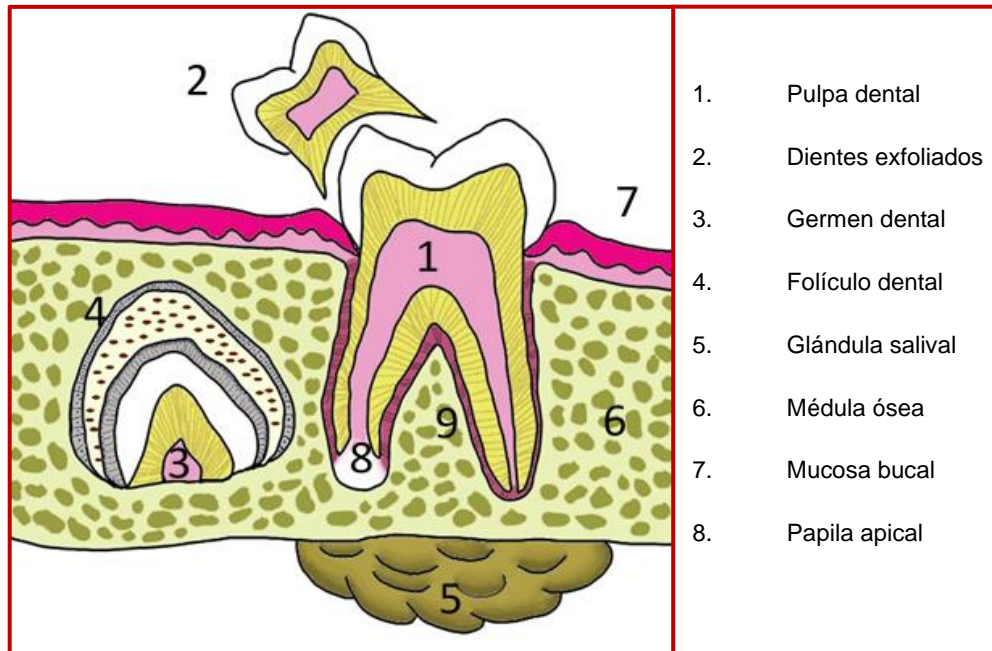


Figura 2 Sitios de obtención de células troncales en la cavidad bucal. La boca es un sitio privilegiado para el aislamiento de células troncales, ya que se pueden aislar de la mayoría de sus estructuras de manera sencilla (5). Figura propia

Tabla 1 Diferencias en las células troncales por sitio de obtención

<b>Origen</b>	<b>Marcadores representativos</b>	<b>Diferenciación <i>in vitro</i></b>	<b>Diferenciación <i>in vivo</i></b>
<i>Pulpa dental</i>	STRO-1, Nestin	dent (od), mes (os, ad, cho, mio), ect (neu)	dent (dentina, pulpa), mes (adiposo, músculo)
<i>Dientes deciduos</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, Nestin, SSEA-3, SSEA-4	dent (od), mes (os, ad, cho, myo, endo), ect (neu)	dent (dentina), mes (hueso, capilares)
<i>Folículo dental</i>	STRO-1, HLA clase 1	dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cemento, PDL), mes (hueso alveolar)
<i>Germen dental</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, HLA class 1	mes (os, ad, endo), ect (neu), end (hep)	mes (hueso)
<i>Papila apical</i>	STRO-1, Nestin, Survivin	mes (ad), ect (neu)	dent (dentina, pulpa)
<i>Ligamento periodontal</i>	STRO-1, Scleraxis	dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cemento, PDL), mes (hueso alveolar)
<i>Mucosa bucal</i>	STRO-1, Oct-4, Nanog, Nestin, SSEA-4, HLA-ABC, Sox-2, Tra2 49, Tra2-54	mes (os, ad, cho), ect (neu, célula glial), end (célula definitiva del endodermo)	mes (hueso, cartílago, adiposo, músculo), ect (epitelio, tejido neural)

Modificado de Egusa, H.; Sonoyama, W.; Nishimura, M.; Atsuta, I.; Akiyama, K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. J Prosthodont Res 2012

De todos los sitios de la boca uno resalta de los demás: la mucosa bucal. Durante toda la vida, la mucosa bucal está en constante agresión por fuerzas ejercidas a través de la masticación y el habla, lo que ocasiona que esté en constante reparación y regeneración. Usualmente sus heridas son reparadas sin dejar cicatriz(8, 34). En algunos estudios se ha visto que su comportamiento es muy parecido a fibroblastos fetales e incluso su matriz extracelular tiene características parecidas a la fetal(8, 35, 36). Debido a estas observaciones se logró aislar células troncales de la lámina propia (8). Su localización es en la lámina propia de la mucosa en nichos perivasculares (Figura 3). De investigaciones realizadas en estas células, sabemos que provienen de la CN (37), porque expresan nestina, y tienen una gran capacidad de diferenciación debido a que expresan marcadores de pluripotencia (Sox2, Oct3/4 y Nanog); además, han demostrado tener la capacidad de diferenciarse a tejidos que provienen del neuroectodermo, como células astrocíticas, neuronas dopaminérgicas, cardiomiocitos y osteoblastos(9-12, 38).

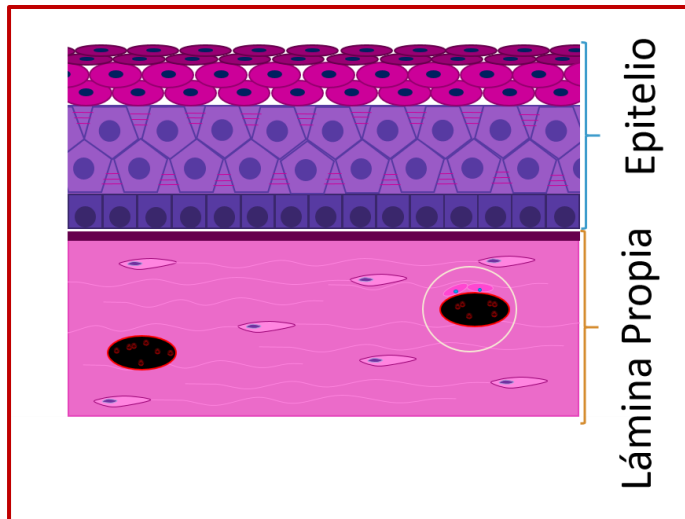


Figura 3 Localización de las hOMSC en la mucosa bucal. La mucosa bucal está compuesta por un epitelio escamoso estratificado para queratinizado que recubre a la lámina propia, la cual está abundantemente vascularizada, y es alrededor de estos vasos sanguíneos que se localizan a las hOMSC(8). Figura propia.

## Córnea

La córnea forma parte de la porción anterior del globo ocular. Está formada por tres capas celulares (epitelio, estroma y endotelio) y dos capas acelulares (Bowman Y Descemet). Su principal característica es su transparencia, que es dada por la conjunción de distintos elementos: su estroma es avascular, la superficie lisa y regular dada por el epitelio, la estructura organizada y constante de los elementos celulares y extracelulares del estroma y la hidratación(39, 40).

El epitelio es escamoso estratificado no queratinizado, tiene de 50 a 60 $\mu$ m de espesor. Las células basales están unidas a la membrana de Bowman a través de hemidesmosomas y filamentos de anclaje, en las capas superiores están unidas entre sí por desmosomas. Y la capa superficial presenta microvellosidades que ayudan a mantener la capa de lágrima sobre la superficie ocular(39).

La renovación y reparación de la córnea se da desde la periferia, en una región llamada limbo, que representa la transición entre la conjuntiva y la córnea; en esta región se encuentra una población de células basales, LESC. Estas células se dividen y van avanzando de manera centripeta hacia el centro de la córnea(40, 41) (Figura 4).



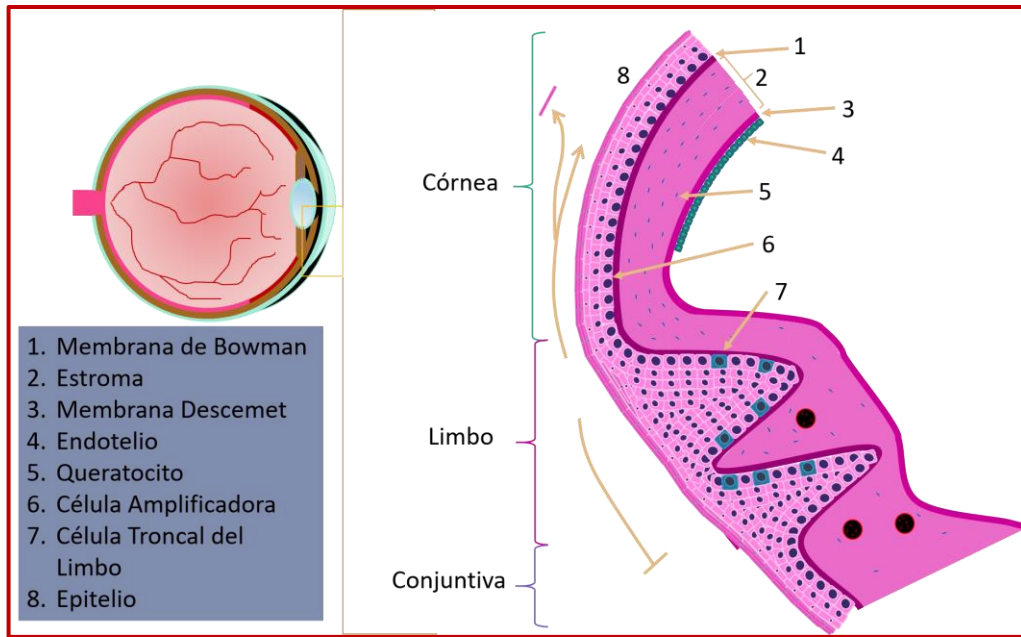


Figura 4 Estructura de la córnea. La córnea es una estructura muy organizada, la cual sirve para mantener su transparencia, su epitelio (que es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado), es mantenido a través de células troncales ubicadas en el limbo, la presencia de estas en conjunto con la estructura particular del limbo, evitan que tanto vasos sanguíneos como la conjuntiva lo invadan(39-41). Figura propia.

### Deficiencia de células troncales del limbo. LESC

Las LESC son importantes para el mantenimiento de la estructura del limbo y su pérdida altera la homeostasis entre la córnea y la conjuntiva que la rodea; esto provoca la invasión por parte de la conjuntiva y vasos sanguíneos hacia el espacio corneal, la consecuencia es la pérdida de la renovación normal de la córnea y su capacidad para repararse, provocando pérdida total o parcial de la visión, y puede afectar uno o ambos ojos. (Figura 5).

La etiología es variada:

1. Congénita (Aniridia, esclerocórnea)
2. Enfermedades de origen extrínseco o trauma (quemaduras térmicas y químicas)
3. Enfermedades Sistémicas
4. Idiopática

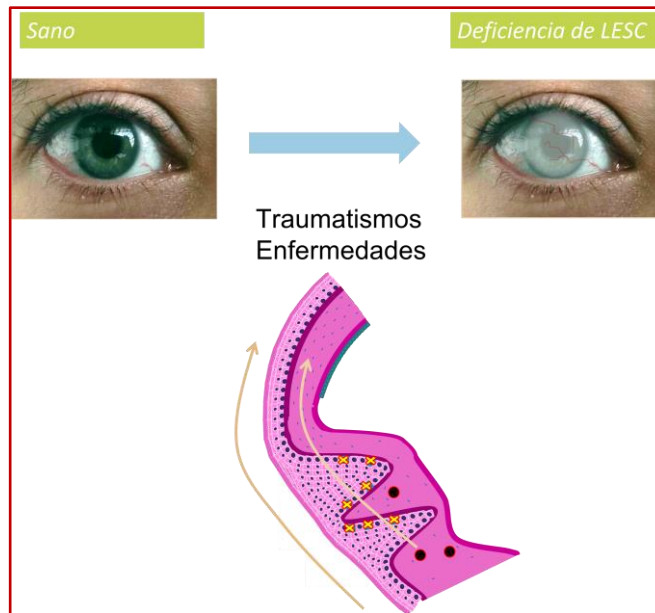


Figura 5 Deficiencia de células del limbo. La pérdida de las LESC, la cual se puede dar por enfermedades o traumatismos, rompe el equilibrio que mantiene la estructura del limbo, lo que tiene como consecuencia que tanto la conjuntiva como vasos sanguíneos invadan el espacio corneal, provocando pérdida de la visión(26). Figura propia.

Existen distintos tratamientos para esta deficiencia, cada uno presenta sus propias ventajas, desventajas y limitaciones:

1. El primero es trasplante de córnea, que es la primera opción de tratamiento, además de que puede presentar rechazo por parte del paciente, el primer reto es la escasez de donadores.(15)
2. Membrana amniótica, se puede utilizar sola o en conjunto con otras terapias. Es de acceso relativamente sencillo, sin embargo, en México hay pocos bancos de membrana amniótica, todavía no se le considera dentro de la estadística de donación de órganos y tejidos, sabemos que se han utilizado 1686 para reparar defectos de córnea y conjuntiva en México.(25, 42).
3. Trasplante de hojas epiteliales de mucosa bucal, se ha utilizado principalmente en estudios clínicos, y se ha demostrado que es una buena opción para estabilizar la superficie ocular, previo a otros tratamientos, y se indica en pacientes que ya han agotado otras opciones.(20, 43-46)
4. Osteo- odonto queratoprotesis, ha tenido cierto éxito, sin embargo, muchas de las series no analizan agudeza visual, con una serie de estudios reportando una media de 52% en recuperación de agudeza visual de 6/18, además la

presencia de complicaciones se presenta en al menos 20% de los pacientes con este tipo de tratamientos(20, 45, 47)

5. Células troncales del limbo, la técnica más utilizada es el trasplante directo autólogo de un fragmento de limbo de un ojo sano, tiene un alto grado de éxito, que tiene como riesgo ocasionar la deficiencia en el ojo sano, y como limitante es que requiere de un ojo sano y no es útil para pacientes con afecciones bilaterales(26, 46).

### *Membrana amniótica*

La membrana amniótica se utiliza en oftalmología de manera amplia, sola o en combinación con otras terapias.

La estructura de la membrana amniótica es sencilla, se compone de un epitelio cúbico simple que se une al estroma avascular por una membrana basal (42, 48)(Figura 6). Sus características físicas (es resistente y transparente) la hacen una opción ideal para la reparación de córnea. Además, tiene propiedades antiinflamatorias, anti-angiogénicas, anti-fibróticas y antimicrobianas, lo que limita su rechazo y permite en cierto grado la recuperación de la transparencia de la córnea(17, 42).

Se ha utilizado ampliamente para el cultivo de células troncales de limbo, ya que permite la migración y diferenciación epitelial, así como el mantenimiento del fenotipo epitelial(25, 26, 44, 49).

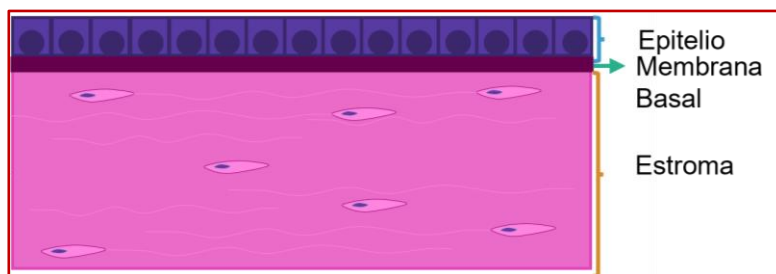


Figura 6 Membrana Amniótica. Forma la parte de la placenta, y su estructura es sencilla, está formada por un epitelio cúbico simple, una membrana basal y un estroma, el cual es avascular, muy parecido al estroma de la córnea. Figura propia(42, 48).

## Planteamiento del problema

La disminución de las células troncales del limbo del epitelio corneal ocasiona una superficie ocular inestable. La córnea comienza a ser invadida por la conjuntiva y vascularizarse, y comienzan a aparecer defectos epiteliales que pueden ocasionar ulceración corneal [47]. 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 [48]. 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 [49]. 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 invasión por la conjuntiva 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 con la etiología [24]. La terapia actual es el trasplante de córnea, que al igual que los trasplantes de otros órganos, tiene su principal limitante en la cantidad de donadores de los cuales se puede obtener este tejido, en México, a pesar de que representa el mayor número de trasplantes realizados en el país, sigue requiriendo de la importación de córneas de otros países, y aun así la lista de espera por este tejido sigue siendo larga.

## Justificación

Una limitante importante para la ingeniería de tejidos es que no se pueden obtener en cantidades suficientes de células troncales, ya que los sitios de acceso son complicados y conllevan riesgo para los pacientes, como es el caso de pacientes con deficiencias de células queratolímbicas. En este contexto, la mucosa bucal, es un sitio de acceso sencillo y con gran capacidad de regeneración; su población de células troncales es de fácil obtención y presentan diversas características parecidas a células troncales embrionarias, que les proporcionan plasticidad. Tanto *in vitro* como *in vivo* han presentado capacidad para diferenciarse a fenotipos no solo del mesodermo, sino también, del ectodermo y endodermo y sabemos que logran hacer epitelio observado en los teratomas bilineales que se obtienen en su colocación en ratas inmunocomprometidas [8]. Ya han sido diferenciadas a hueso, neuronas dopaminérgicas y astrocitos [9-11]. El epitelio de la mucosa bucal ha sido utilizado anteriormente con el propósito de tratar el simblefarón y la deficiencia bilateral de células troncales del limbo [50].

## Hipótesis:

Al cultivar hOMSC sobre membrana amniótica utilizando SHEM, se observará un incremento en los marcadores de epitelio corneal.

**Objetivo general:** Generación y caracterización de un injerto hOMSC-MA

## Objetivos específicos:

- Obtención de hOMSC a partir de mucosa bucal.
- Caracterización de hOMSC.
- Evaluación de la diferenciación epitelial de hOMSC.
- Generar y caracterizar un injerto hOMSC-MA.

# Materiales y Métodos

## *Medios Cultivo Celular*

Se utilizaron distintos medios dependiendo del ensayo a realizar: **Medio para transporte:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), antibióticos 3x (300 µg/ml estreptomina y 300 UI/ml penicilina, gentamicina 150µg/ml, anfotericina B 3.75µg/ml), piruvato de sodio 10mM y 1:10 de MEM (aminoácidos no esenciales 100x: Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, L-Ácido Aspártico, L-Ácido Glutámico, L-Prolina, L-Serina 10mM). **Medio de mantenimiento:** DMEM, suero fetal bovino (SFB) de 5% al 20% y antibióticos 1x (100 µg/ml estreptomina y 100 UI/ml penicilina, gentamicina 100µg/ml, anfotericina B 2.5µg/ml), piruvato de sodio 10mM y 1:10 MEM. **Medio Adipogénico:** DMEM, SFB 10% antibióticos 1x, piruvato de sodio 10mM, 1:10 MEM, isobutil-metil-xantina al 0.5mM, indometacina 0.05mM, dexametasona 1mM. **Medio Condrogénico:** DMEM, SFB 2%, antibióticos 1x, piruvato de sodio 10mM, 1:10 de MEM, 1 µg/mL de ácido ascórbico, ITS-G 1ml del stock a 100x (Insulina 0.1721mM, Transferina 0.0068mM, Selenito de Sodio 0.0038mM) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), dexametasona a 10<sup>-5</sup>mM, y 10 ng/ml hr-TGFβ (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico). **Medio Osteogénico:** DMEM, SFB 10% antibióticos 1x, piruvato de sodio 10mM, 1:10 MEM, β-Glicerofosfato 10mM, 50 µg/mL de ácido ascórbico y dexametasona 10<sup>-8</sup>M. **Medio de mantenimiento 2 (DMEM/F12):** DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1:1 con Medio Ham 12), SFB al 5% o 10%, antibióticos 0.5x (50 µg/ml estreptomina y 50 UI/ml penicilina, gentamicina 50µg/ml, anfotericina B 1.25µg/ml), piruvato de sodio 10mM y 1:10 de MEM. **Medio de mantenimiento y diferenciación epitelial (SHEM):** DMEM/F12, SFB al 5%, antibióticos 0.5x, Dimetilsulfóxido (DMSO) 0.5%, hEGF 2ng/ml (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), ITS (Insulina 5µg/ml, Trasnferina 5µg/ml, Selenito de sodio 5ng/ml) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), Hidrocortisona 0.5µg/ml subunidad a de la Toxina de Cólera (TCA) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico) 30ng/ml. Para los experimentos se utilizaron los pases celulares 2 al 7. Para aumentar el número celular previo a los experimentos las células se sembraron en cajas de 75cm<sup>2</sup>, en el medio de mantenimiento correspondiente para el experimento a realizar. Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% humedad. Todos los reactivos fueron obtenidos, a menos que indique lo contrario, de Thermofisher Scientific, Mexico City, Mexico

### *Obtención de la mucosa bucal:*

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CIE/0303/02/2018).

Se obtuvieron muestras de mucosa bucal (tejido de desecho de la cirugía de terceros molares) de 14 pacientes (19-68 años), aparentemente sanos (de acuerdo con su expediente clínico), que requirieran extracción de terceros molares, previo consentimiento informado. Se separaron en dos grupos: menores de 40 años (<40 años) y mayores de 40 años (>40 años). En total se obtuvieron 8 muestras de pacientes <40 años y 6 muestras de pacientes >40 años. Al obtener las muestras inmediatamente después de la cirugía se lavaron con solución salina estéril y se colocaron en medio para transporte.

### *Obtención de hOMSC*

Las muestras colocadas en medio de transporte se lavaron tres veces con el mismo medio, se colocaron en platos Petri y se maceraron con una bisturí con hoja del #15 y tijeras Goldman-Fox. Se volvieron a lavar tres veces con medio de transporte y buffer de fosfatos salino (PBS) con antibióticos 3x, y se colocaron en una solución de dispasa II mg/ml con colagenasa tipo III 2mg/ml (Thermo Fisher Scientific México City, México), durante 2hrs a 37°C, se mezclaron en vortex cada 15 min. Terminado el tiempo de incubación se lavaron con medio de mantenimiento tres veces, y se colocaron en cuatro cajas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>. Las cajas se mantuvieron con cambio de medio cada tercer día, hasta 90% de confluencia, se desprendieron con Tripsina 0.25%-EDTA se centrifugaron y lavaron 3 veces con medio de mantenimiento y se sembraron en cajas de 75cm<sup>2</sup> (Pase 1). Se realizaron cultivos de célula única para confirmar la capacidad clonogénica de las células. Se utilizaron pases del 2 al 7 para los experimentos.

### *Obtención de Células epiteliales del Limbo (LEC)*

Se obtuvieron rodetes limbales, del Banco de Ojos del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. Se lavaron con PBS para retirar el medio de mantenimiento y se retiró el iris, conjuntiva y endotelio sobrante tallando suavemente con una hoja de bisturí. Se retiró el excedente de esclera dejando solo 1mm de la misma (con el objetivo de no dañar el



limbo). Los anillos se colocaron en dispasa II 2mg/ml durante 40min a 37°C; se lavaron una vez en PBS, y se cortaron en fragmentos de 2mm aproximadamente. Se colocaron dos fragmentos por membrana y pozo, con la cara epitelial hacia arriba, se les colocó una gota de SFB, se dejaron adherir 8hrs; transcurrido el tiempo se les colocó medio SHEM.

### *Caracterización Celular.*

**Viabilidad.** Se realizó el conteo celular por paciente, se utilizaron células del pase 2. Se cultivaron en cajas de 75cm<sup>2</sup> para expandir las líneas celulares, se dejaron hasta 90% confluencia. Se desprendieron con Tripsina 0.25%-EDTA (Thermo Fisher Scientific México City, México) se centrifugaron y lavaron 3 veces con medio de mantenimiento, se colocaron en 1ml de volumen final. Para el conteo celular y viabilidad se utilizó el dispositivo Countess (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), en el cual se deben colocar 10µl de células con medio y 10µl de azul tripán en una laminilla Countess, el conteo se repitió tres veces por grupo. Se contó total de células, células vivas, células muertas, viabilidad. Los resultados se expresan en la media±SD (<40 años vs. >40 años).

**Proliferación Celular.** Se realizó con el kit Presto Blue (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. En una placa de 96 pozos se colocaron 5x10<sup>3</sup> células por pozo, se mantuvieron 24hr sin cambios para permitir su adherencia, se retiró el medio y se colocaron 90µl de medio y se adicionaron 10µl del reactivo Presto Blue, se incubó a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub>, 100% humedad. Después de 2 horas de incubación se realizaron mediciones a 570nm y 600nm, y se repitió durante cuatro días. Como control negativo se utilizaron pozos que solo contenían medio y su valor se restó a los valores de los pozos con células. Utilizando coeficientes de extinción molar se calculó el porcentaje de reducción del Presto Blue. Los resultados se expresan en la media±SD (<40 años vs. >40 años).

**Inmunocitofluorescencia.** Se colocaron 1x10<sup>3</sup> células en cubreobjetos previamente cargados con poli L-lisina de 12mm, se dejaron en medio de mantenimiento toda la noche; se retiró el medio, se lavaron con PBS y se fijaron con para formaldehído (PFA) 1% por 20 min, se lavaron 2 veces con PBS. Se colocaron en una cámara húmeda y se prepararon diluciones 1:50 de los anticuerpos primarios CD105 (goat anti-human), CD90

(goat anti-human); Sox2 (rabbit anti-human), Nanog (rabbit anti-human); Oct3/4 (mouse anti-human), CD73 (mouse anti-human) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), HNA (mouse anti-human) (Abcam PLC, Cambridge, UK) en BSA1%, se colocaron 100µl a cada cubreobjetos y se dejaron a 4°C toda la noche; Se lavaron una vez con PBST y dos veces con PBS. Se realizaron diluciones 1:100 (goat anti-mouse FITC), 1:400 (goat anti-rabbit-Alexa 546), and 1:400 (rabbit anti-goat-Texas Red) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), se incubaron a temperatura ambiente durante 2hrs, se realizaron un lavado con PBST y dos con PBS, se montaron en laminillas utilizando Glicerol diluido en PBS 1:2. Se observaron en microscopio de epifluorescencia con los canales recomendados para los anticuerpos secundarios utilizados. Como control negativo, se omitió el anticuerpo primario, se incubó con BSA 1%, posteriormente se colocó el anticuerpo secundario de manera habitual.

**Citometría de Flujo.** Se juntaron las células de los dos grupos de edad (<40 años y >40n años) en un solo vial para el siguiente ensayo, se utilizaron células del pase 4. Se levantaron con Tripsina 0.25%-EDTA se centrifugaron y lavaron 3 veces con medio de mantenimiento. Se determino el número celular; dependiendo de la molécula a medir se siguieron dos protocolos distintos. Para los marcadores de superficies CD73PeVio770 (clone REA804), CD90-APC (clone REA897), CD105-APCVio770 (clone REA794) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Se utilizaron  $2 \times 10^5$  células. Se retiro el medio y se lavaron con buffer frío (PBS + BSA 0.5% + EDTA 2mM), se diluyó el anticuerpo 1:50 en buffer frío, se incubo por 30 min a 4°C en oscuridad, se lavaron 2 veces, se fijaron con PFA 1% 10 min, se lavaron y suspendieron en PBS. Para los marcadores intracelulares Nanog-APC (clone REA314), Oct3/4-APC (clone REA622) y Sox2-APC (clone REA320) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), se utilizó el kit FOXP3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) para tinción intracelular; se determinó el número celular y se colocaron  $2 \times 10^5$  se lavaron y se suspendieron en buffer de permeabilización/fijación y se incubaron 30min a 4°C en oscuridad, se lavaron una vez con buffer frio y dos veces con buffer de permeabilización, se colocaron 100µl de buffer de permeabilización y 10µl de anticuerpo se incubo 30 min a 4°C en oscuridad, se lavaron dos veces con buffer de permeabilización, una vez con buffer frío y se suspendieron en PBS. Se leyeron en un citómetro de flujo con la combinación de láser y

filtros adecuada para los anticuerpos utilizados, BD flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

### *Diferenciación Celular Fenotipos Mesenquimales*

**Osteogénico.** En cajas de 6 pozos se colocaron  $1 \times 10^4$  células y se dejaron toda la noche en medio mantenimiento, posteriormente se les colocó medio osteogénico. Se mantuvieron por 21 días con cambio de medio cada tercer día. En el día 21 se retiró el medio, de dos pozos se obtuvo RNA, dos pozos se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% durante 30 min, se lavaron dos veces con PBS y se colocó una solución de Alizarina roja al 2% a cuál se dejó toda la noche, posteriormente se lavó con PBS 3 veces.

**Condrogénico.** En cajas de 6 pozos se colocaron  $1 \times 10^4$  células y se dejaron toda la noche en medio mantenimiento, posteriormente se les colocó medio condrogénico. Se mantuvieron por 21 días con cambio de medio cada tercer día. En el día 21 se retiró el medio, de dos pozos se obtuvo RNA, dos pozos se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% durante 20 min, se lavaron dos veces con PBS y se colocó una solución de Azul Alciano al 3% a cuál se dejó toda la noche, posteriormente se lavó con PBS 3 veces.

**Adipogénico.** En cajas de 6 pozos se colocaron  $1 \times 10^4$  células y se dejaron toda la noche en medio mantenimiento, posteriormente se les colocó medio adipogénico. Se mantuvieron por 21 días con cambio de medio cada tercer día. En el día 21 se retiró el medio, de dos pozos se obtuvo RNA, dos pozos se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% durante 15 min, se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>Odd y se colocó una solución de Rojo Oleoso al 5% a cuál se dejó 24hrs a 4°C, posteriormente se lavó con una vez con H<sub>2</sub>Odd.

**RT-PCR.** La obtención de RNA se realizó con utilizando tiocinato de guanidina (Trizol) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El RNA fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro NanodropND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) con 1µl de muestra. El rango se estableció entre 260 y 280nm para medir la pureza del RNA; se consideró adecuado si se encontraba entre 1.8 y 2 de densidad óptica. Se utilizaron diez nanogramos por reacción, el nivel de RNA mensajero se cuantificó utilizando RT-PCR en tiempo real de un paso con el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA). Se mezclaron reacciones de 25µL con las siguientes condiciones: (Síntesis de cDNA) 50°C por 3 min, desnaturalización a 95°C por 5 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60° por 30 segundos y finalmente 40°C por 1 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Valencia, CA, USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los niveles de expresión se obtuvieron realizando el método delta-delta CT normalizando con GAPDH. Los primers utilizados están reportados en la tabla 1.

Tabla 2 Secuencias para RT-qPCR

Gen		Secuencia 5´-3´	Tamaño (nt)	Tm (°C)
<b>SOX9</b>	F	GTA ATC CGG GTG GTC CTT CT	20	58.8
	R	GAC GCT GGG CAA GCT CT	17	59.68
<b>OSX</b>	F	GCC AGA AGC TGT GAA ACC TC	20	59.12
	R	GCT GCA AGC TCT CCA TAA CC	20	58.98
<b>PPAR- Y</b>	F	GAG AGA TCC ACG GAG CTG AT	20	58.67
	R	AGG CCA TTT TGT CAA ACG AG	20	56.91
<b>GAPDH</b>	F	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	21	59.4
	R	GCAACAATATCCACTTTACCAAGAGTTAA	29	59.5

### *Diferenciación Celular Epitelial*

Tres membranas amnióticas se obtuvieron del Banco de Membrana Amniótica del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, de voluntarias que tuvieron cesárea electiva, previo consentimiento informado, se preservaron a -80°C hasta su uso como se reportó previamente(42). Se lavaron dos veces en PBS, y colocadas en 2 mg/ml de dispasa II (Thermo Fisher Scientific México City, México) por 40 min con el lado epitelial hacia el plato de Petri, posteriormente fueron lavados con PBS. El epitelio se quitó mecánicamente tallando suavemente las membranas con un hisopo de algodón estéril. A pozos trans-well se les retiró la membrana de PC y se colocó en su lugar a las membranas amnióticas desepitelizadas sostenidas con una liga de hule. Se realizaron experimentos con tres condiciones: 1) hOMSC con DMEM/F12, 2) hOMSC con SHEM y 3) LEC, además hOMSC se cultivaron en cubreobjetos con las condiciones 1 y 2. Se

mantuvieron hasta confluencia con cambio de medio cada dos días. Las membranas y los cubreobjetos se procesaron para análisis histológico e inmunofluorescencia.

### *Análisis Histológico e Inmunofluorescencia*

Las membranas se fijaron en solución de Bouin y embebidas en parafina, se realizaron cortes de 5µm de grosor, y montadas en laminillas de vidrio. Las laminillas se desparafinaron en concentraciones descendentes de etanol y agua destilada; una laminilla por condición se tiñó con hematoxilina y eosina. La inmunofluorescencia se realizó como fue descrita previamente, las hOMSC en cubreobjetos y las membranas se incubaron en una cámara húmeda con una dilución 1:100 de los anticuerpos primarios: CK3 (rabbit anti-human) CK12 (goat anti-human), CK19 (mouse anti-human) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Pan-Cadherin (mouse anti-human) E-cadherin (mouse anti-human) (Abcam PLC, Cambridge, UK) por 2hrs, lavadas dos veces con PBST y una vez con PBS. Se realizaron diluciones 1:800 de los anticuerpos secundarios: goat anti-rabbit-FITC, goat anti-mouse-Alexa 594 and goat anti-rabbit-Alexa 546 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Y se montaron con SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Se observaron en microscopio de epifluorescencia con los canales recomendados para los anticuerpos secundarios utilizados. Como control negativo, se omitió el anticuerpo primario, se incubó con BSA 1%, posteriormente se colocó el anticuerpo secundario de manera habitual.

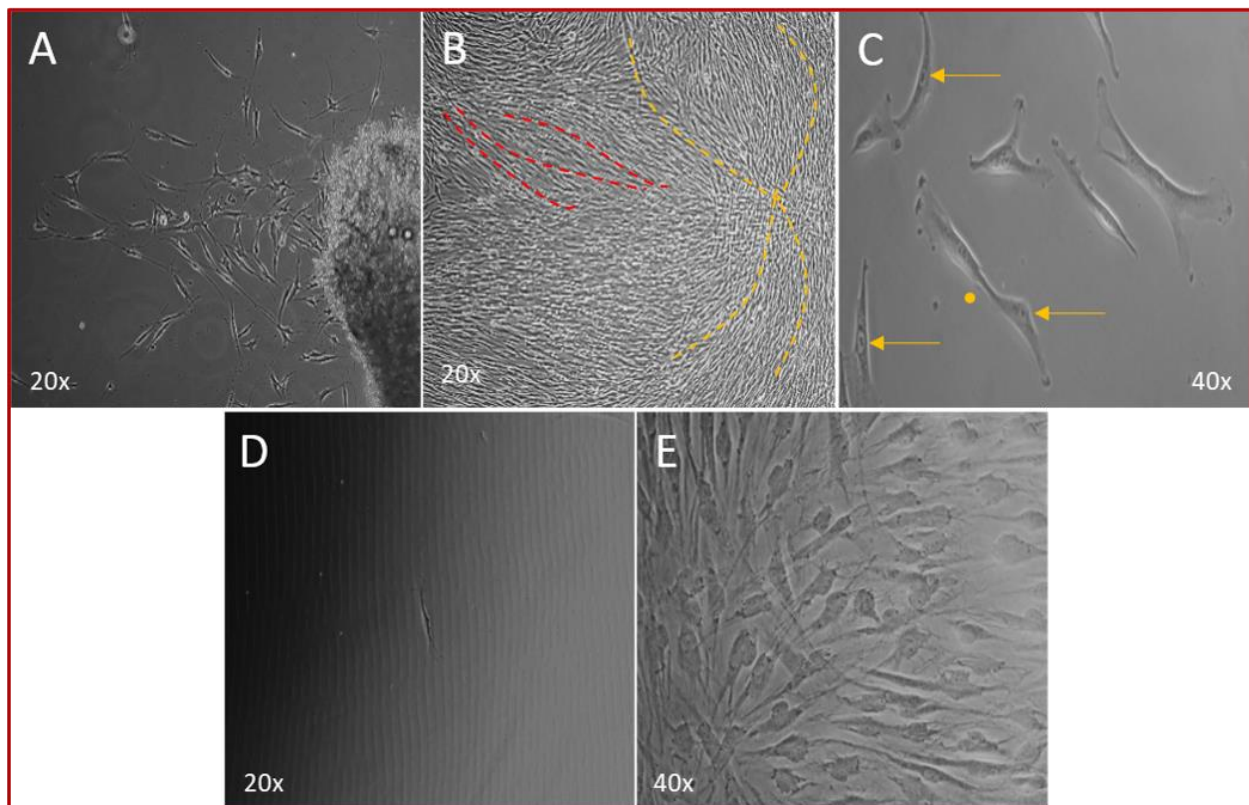
### *Análisis estadístico*

Los resultados están expresados como media±SD. Viabilidad celular, se realizaron experimentos por triplicado, se obtuvo la media por grupo y la desviación estándar, se analizó con la prueba T de Student. RT-qPCR, los experimentos se realizaron por triplicado, se obtuvo la media y la desviación estándar se analizaron con T de Student para analizar las diferencias entre dos grupos. Para analizar la proliferación se realizaron experimentos por triplicado, se obtuvo la media y desviación estándar por grupo y tiempo, se realizó un ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron en GraphPAd Prism 8.

# Resultados

## *Obtención de hOMSC*

Se lograron obtener ocho líneas celulares. El tiempo promedio de obtención del pase 1, fue de 31 días, partiendo de tejidos que en promedio midieron 1.4 cm<sup>3</sup>. Las células comenzaron a salir del explante en el día 1 posterior a los procedimientos obtención. Las células presentaron un aspecto estrellado, se observaron abundantes mitosis (se observaron algunos husos mitóticos y células en citocinesis) y células con proyecciones alargadas y núcleo central con nucleolo prominente. Los explantes se dejaron hasta confluencia al 90-100% para realizar el pase 1, momento en el cuál las células se observaron de forma fibroblastoide, formando corrientes cortas, de aspecto estoriforme. Se lograron obtener cultivos celulares partiendo de células únicas, comprobando la capacidad clonogénica de las células (figura 7).



*Figura 7 Obtención de hOMSC. Explante de mucosa bucal, las células se observan migrando hacia afuera del tejido cultivado (A), Cultivo a 90-100% de confluencia con células agrupadas en corrientes (líneas rojas) y formando patrones estoriforme (líneas amarillas) (B). Células mostrando un núcleo central con nucleolo prominente (flecha amarilla) célula en mitosis (punto amarillo) (C). Cultivo de célula única al día 1 (D). Colonia de células mostrando un fenotipo morfológico homogéneo (E).*

## Caracterización Celular hOMSC

**Conteo y Proliferación.** El número celular, viabilidad y proliferación fueron determinados agrupando a los pacientes en dos grupos de edad, ya sea mayores (>40 años) o menores de 40 años (<40 años). Nuestros resultados revelaron que las poblaciones celulares de pacientes >40 años no mostraron diferencias de número y viabilidad ( $p=0.06$ ), en la proliferación se observó diferencia en el día uno del cultivo, pero al final del ensayo no se observaron diferencias significativas ( $p=0.1763$ ) (Figura 8).

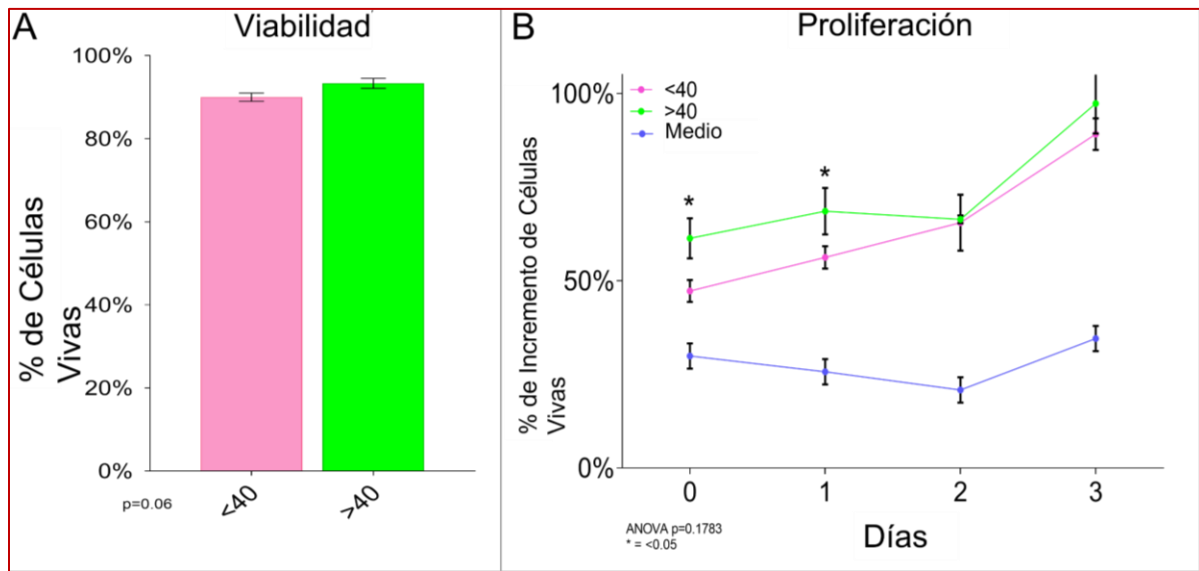
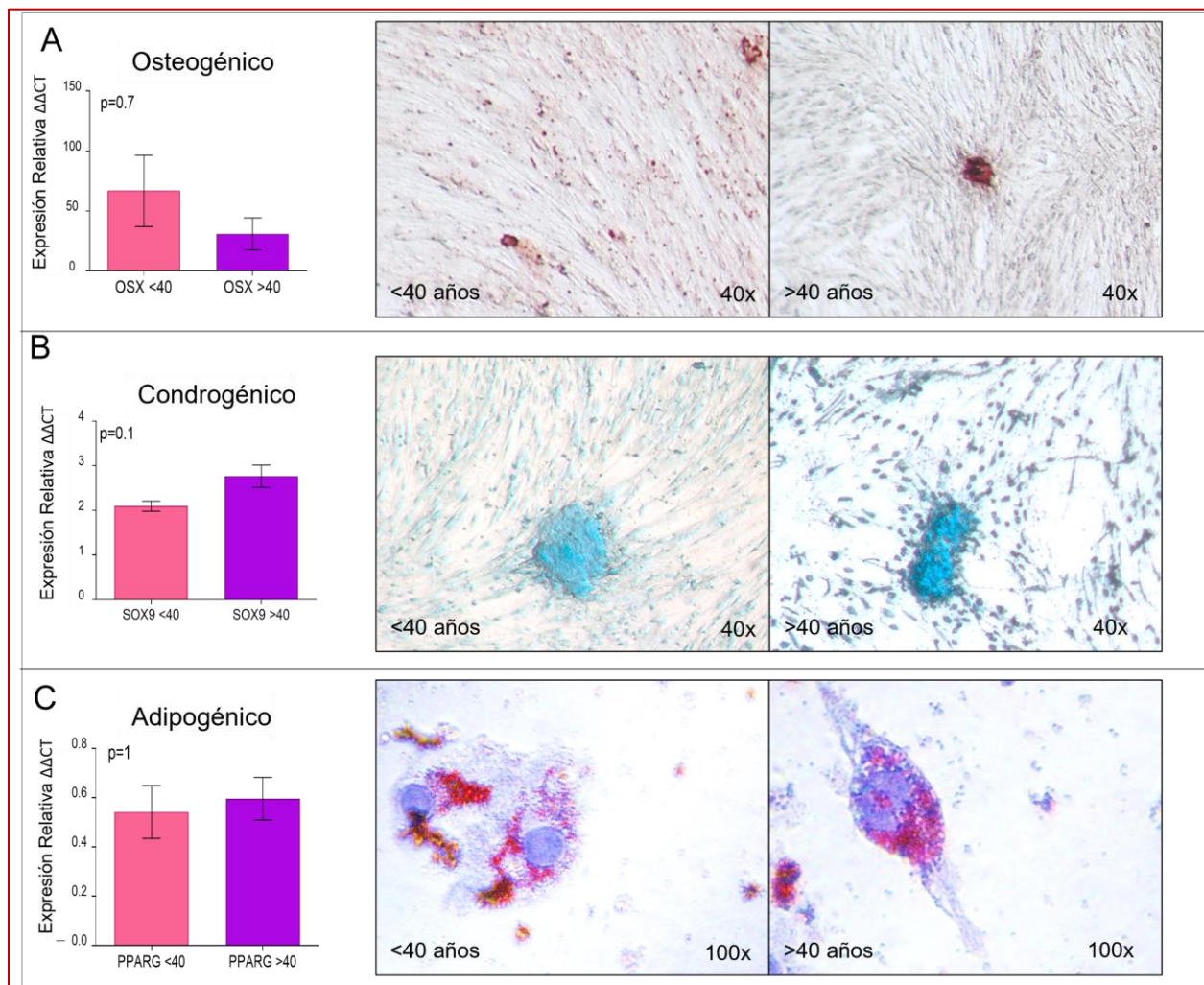


Figura 8 Viabilidad y Proliferación Celular. Comparación de hOMSC entre los dos grupos de edad. Viabilidad para ambos grupos fue superior al 90% y no se observaron diferencias significativas (A). en el ensayo de proliferación se observa una pequeña diferencia entre grupos en el día 1, pero al día 3 ambos grupos presentaron el mismo nivel de proliferación (B). Las barras representan media $\pm$ SE, n=3 por grupo).

**Diferenciación Mesenquimal.** Los mismos grupos se utilizaron para confirmar si había variaciones en la capacidad de diferenciación hacia los fenotipos mesenquimales: condrogénico, osteogénico y adipogénico. Se utilizaron tinciones especiales para cada uno de los fenotipos (alizarina roja, azul Alciano y rojo oleoso) así como RT-qPCR con marcadores específicos de cada fenotipo (Sox9, Osx y PPAR $\gamma$ ). Los ensayos confirmaron que ambos grupos podían diferenciarse a cada fenotipo, en el fenotipo osteogénico ambos grupos expresaron el marcador OSX, sin diferencias significativas



( $p=0.7$ ) y se observaron depósitos de calcio con alizarina roja; en el fenotipo condrogénico, ambos grupos expresaron el marcador Sox9 sin diferencias significativas ( $p=0.1$ ), y se observó matriz extracelular rica glicosoaminoglicanos; en el fenotipo adipogénico, no se observó el marcador PPAR $\gamma$  (ambos grupos tuvieron valores menores a 1), pero si se observaron vesículas de lípidos, por medio de la tinción de rojo oleoso (Figura 9). Ya que estos ensayos demostraron que no había diferencias significativas entre grupos el resto de los ensayos se realizaron al azar.



*Figura 9 Comparación en la capacidad de diferenciación entre grupos de edad. Fenotipo osteogénico, ambos grupos de edad mostraron un incremento de Osx, un marcador de osteoblastos, así como presencia de depósitos de calcio demostrados por la tinción de alizarina roja (A). Fenotipo condrogénico. Ambos grupos de edad mostraron un incremento de Sox9, un marcador de condrocitos, así como presencia de matriz extracelular con presencia de polisacáridos demostrados por la tinción positiva con azul Alciano (B). Fenotipo adipogénico, aunque no se observó incremento en la expresión de PPAR $\gamma$ , se observaron vesículas positivas a rojo oleoso que indica la presencia de lípidos (C). Barras representan media $\pm$ SEM, n=3 por grupo).*



**Citometría de flujo.** Se encontró la presencia de los marcadores de MSC: CD90, 65.8%; CD73, 55.9%; CD105, 11.5%; De los marcadores de pluripotencia, Nanog, 26.8%; Sox2 11.5% and Oct3/4 24.3% (Figura 10).

**Inmunofluorescencia.** En la tinción con HNA, se observó fuertemente en núcleo y nucleolo. CD90 se observó con intensidad leve en puntos focales. CD73 se observó de manera intensa en regiones de la membrana celular. CD105 se observó positivo localizado en regiones pequeñas de la membrana plasmática. Oct3/4 se observó tanto en citoplasma como de manera nuclear. Nanog se observó en algunas células de manera intensa en el núcleo y en otras en citoplasma y núcleo. Sox2, se observó principalmente en citoplasma y levemente en núcleo. (Figura 10).

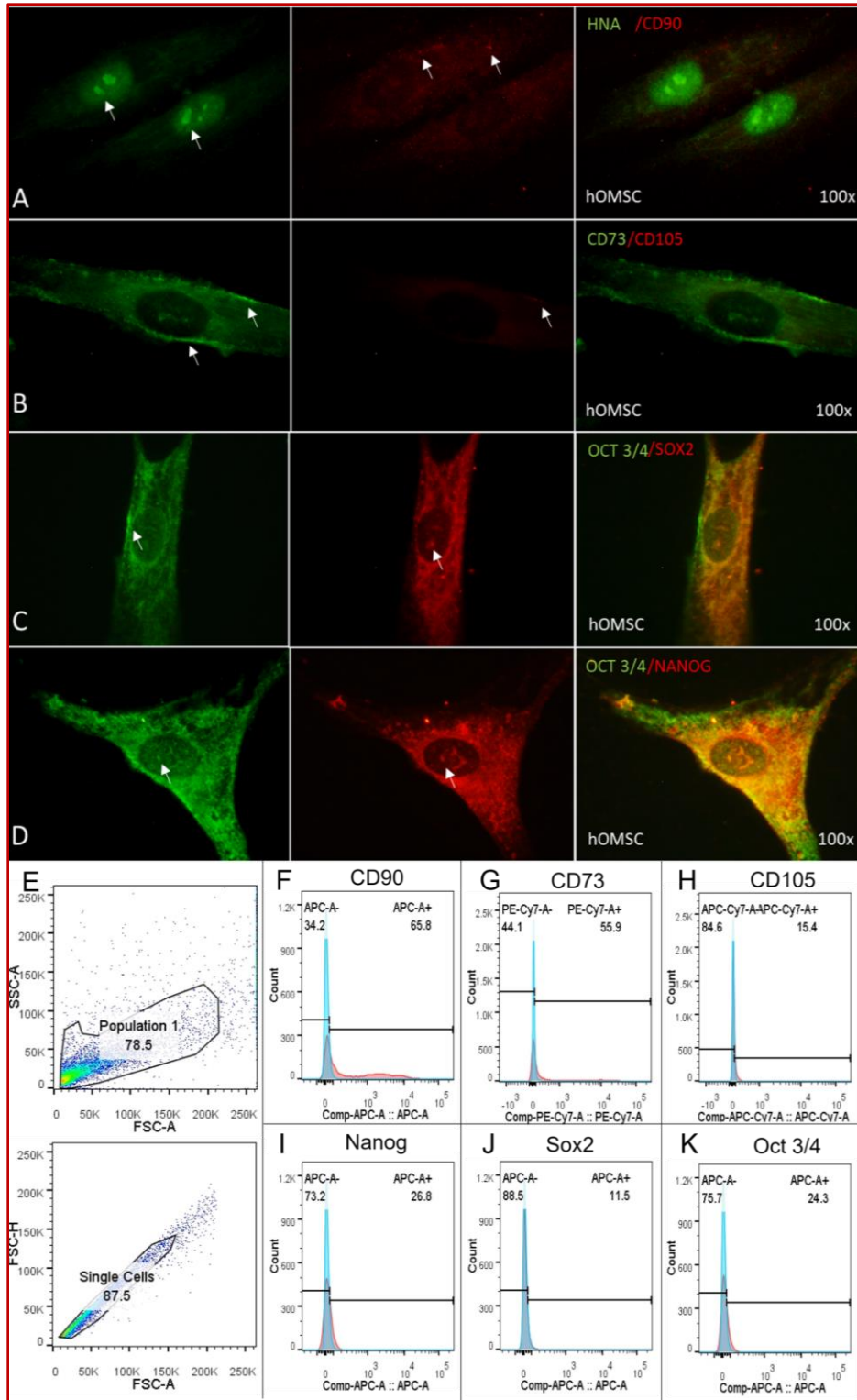


Figura 10 Caracterización Celular de hOMSC. A-D) Inmunofluorescencia de marcadores de MSC y pluripotencia, las flechas blancas marcan las áreas de positividad. E) Gates para la citometría de flujo. Porcentaje de células positivas en el cultivo de hOMSC, marcadores de MSC: F) CD90 65.8%, G) CD73 55.9% H) CD105 15.4% marcadores de pluripotencia: I) Nanog 26.8%, J) Sox2 11.5% and K) Oct3/4, 24.3%.

## *Diferenciación Epitelial*

**Cultivo celular sobre membrana amniótica.** En los cultivos sobre la membrana amniótica, para la diferenciación epitelial se observó lo siguiente: las LEC, son de forma poligonal, con bordes celulares claros, crecían en una misma dirección sin migración celular fuera de la colonia; estos cultivos llegaron a confluencia sobre su membrana en 8 días a partir del procedimiento de explante. Las hOMSC con DMEM/F12, se observaron heterogéneas, con apariencia alargada o estrellada, con migración celular y formación de colonias lejos de la zona de colocación original, formando corrientes cortas; sobre la membrana amniótica, se observaban en desorden agrupadas en el centro de la membrana donde fueron originalmente colocadas, al día 21 se observaron algunos contornos celulares a alto poder; las células cultivadas sobre cubreobjetos se les realizó un pase al llegar a confluencia sobre este. Las hOMSC con SHEM se observaban de aspecto estrellado con algunas células alargadas, presentaban migración celular, en grupo, no se observaron colonias lejos de la región de colocación original; en la membrana amniótica al día 21 se observan alargadas y agrupadas en el centro de esta, sin embargo, se encontraron organizadas de forma paralela una con otra (Figura 11).

**Análisis histológico.** En los cortes histológicos de las membranas se observó lo siguiente en cuanto a morfología celular: las LEC se observaron organizadas en una sola capa, de aspecto cúbico con núcleo central y abundante citoplasma. Acomodadas a lo largo de la membrana de manera uniforme, en algunas zonas de la membrana se observó estratificación de éstas. En las células cultivadas en DMEM/F12, se observó el núcleo celular sobre la membrana, pero el citoplasma era escaso, se encontraron colocadas al azar sobre la misma, a veces se observaban células individuales o cúmulos de células. Las células cultivadas en SHEM, se encontraron repartidas al azar en la membrana, sin embargo, se observaron núcleos amplios y abundante citoplasma (Figura 11).

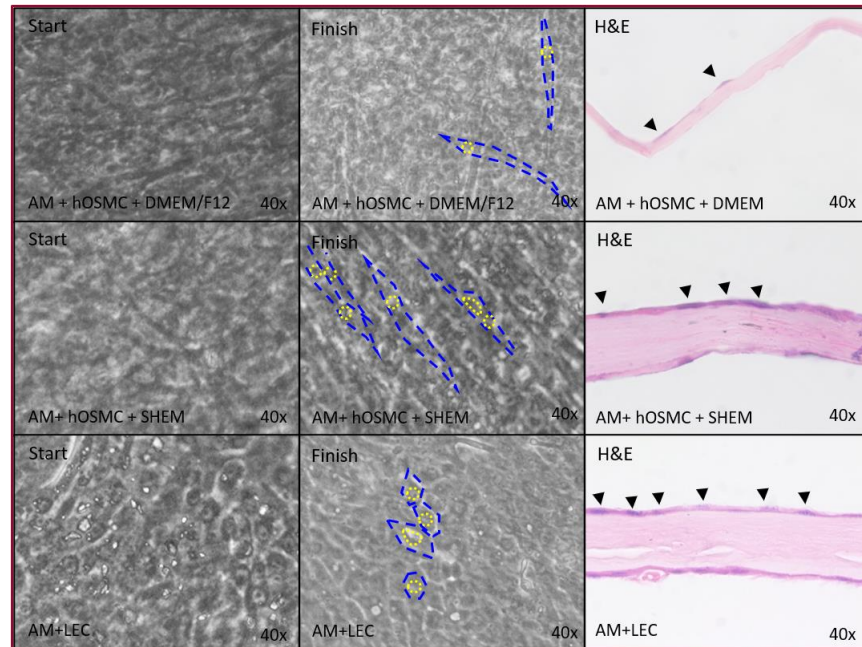


Figura 11 Cultivo e histología diferenciación epitelial sobre membrana amniótica. La comparación entre las tres condiciones durante el periodo de cultivo y la tinción de H&E mostraron diferencias entre grupos. El cultivo con medio mantenimiento mantuvo su fenotipo fibroblastoide con núcleos prominentes (flechas negras), pero con escaso citoplasma (AM+hOMSC+DMEM/F12). Las LEC, que se utilizaron como el control epitelial, exhibieron las características epiteliales habituales, eran pequeñas, poligonales con un núcleo central y con una relación 1:1 núcleo citoplasma (AM+LEC). El grupo experimental mostró un aspecto fibroblastoide con núcleo prominente (flechas negras), sin embargo, se organizaron en palizadas y mostraron incremento en la relación núcleo citoplasma observado en la tinción con H&E (AM+hOMSC+SHEM).

**Inmunofluorescencia.** Se realizó inmunofluorescencia a las células cultivadas en los cubreobjetos, a las membranas y a los cortes de mucosa bucal. Las hOMSC cultivadas en cubreobjetos con medio DMEM/F12, eran positivas a E-Cad de manera uniforme en el citoplasma, Pan-Cytoker leve en citoplasma, CK3 intenso en citoplasma, CK19 leve en citoplasma; y fueron negativas a Pan-Cad y CK12. Las hOMSC cultivadas en medio SHEM fueron positivas a Pan-Cad leve en citoplasma, E-Cad de manera puntual en el citoplasma, Pan-Cytoker en citoplasma, CK3 intenso en citoplasma, CK12 leve en citoplasma, CK19 leve en citoplasma (Figura 12). En las membranas amnióticas se observó la siguiente expresión mediante inmunofluorescencia: CK3 fue positivo en las tres condiciones. CK12 Positivo en LEC y leve en SHEM, negativo en DMEM/F12. CK19, se observó positivo en LEC y SHEM, y levemente positivo en DMEM/F12. E-Cad, fue positivo en las tres condiciones. Pan-Cad, positivo en LEC, positivo en algunas en SHEM, y negativo en DMEM/F12 (Figura 13).

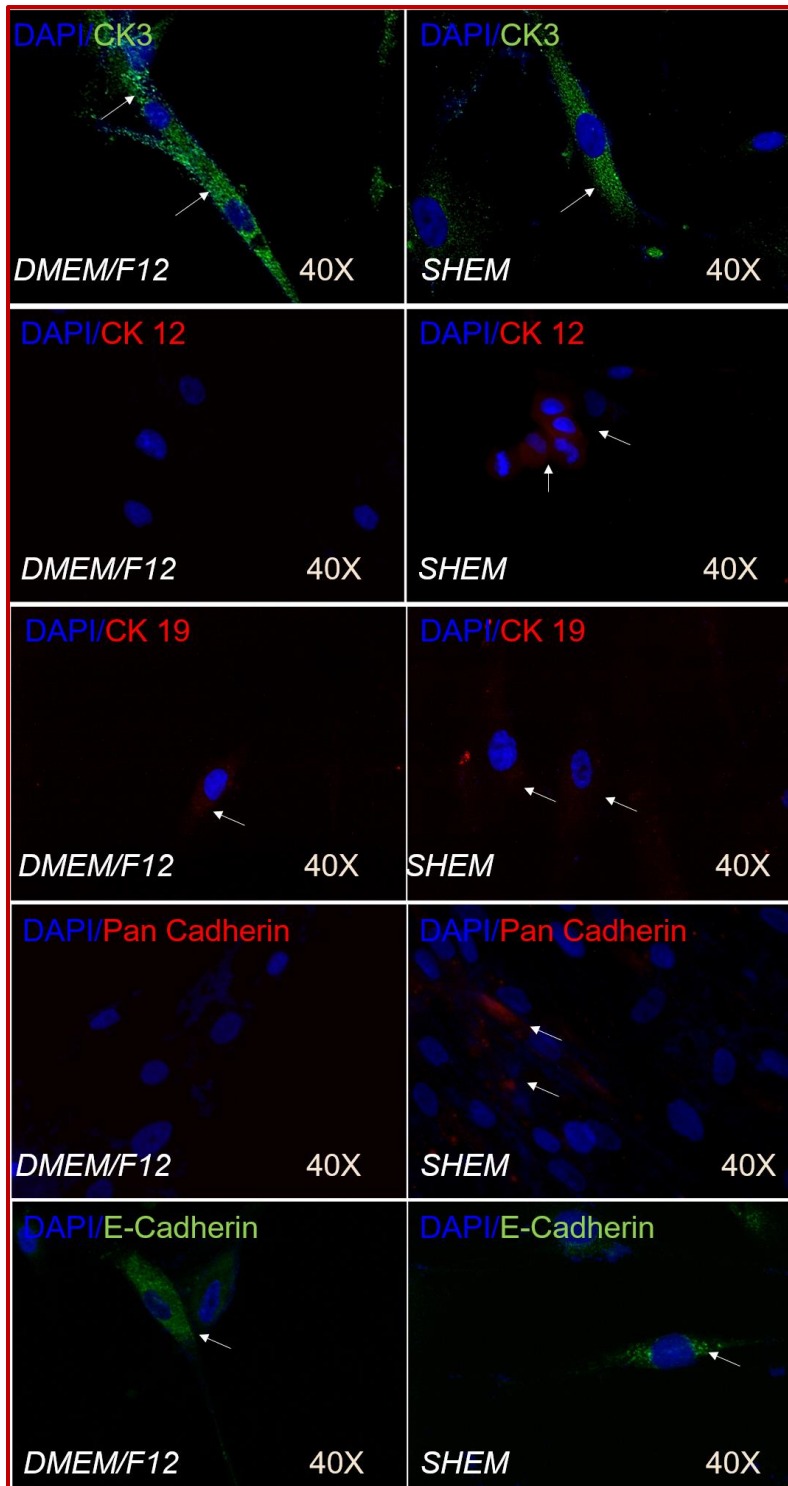


Figura 12 Inmunofluorescencia diferenciación epitelial hOMSC. Los grupos SHEM y DMEM presentaron positividad a CK3 en el citoplasma. La CK19 en estuvo presente en ambos grupos, pero en baja expresión en el citoplasma. La E-cadherina estuvo presente en ambos grupos, pero se encontró en citoplasma cuando debería observarse en la membrana, la diferencia más importante es que se encontró difusa en el grupo DMEM y localizada focalmente en el grupo SHEM. Las hOMSC cultivadas con SHEM expresaron CK12 y Pan-cadherina. Las flechas blancas marcan las zonas de positividad.

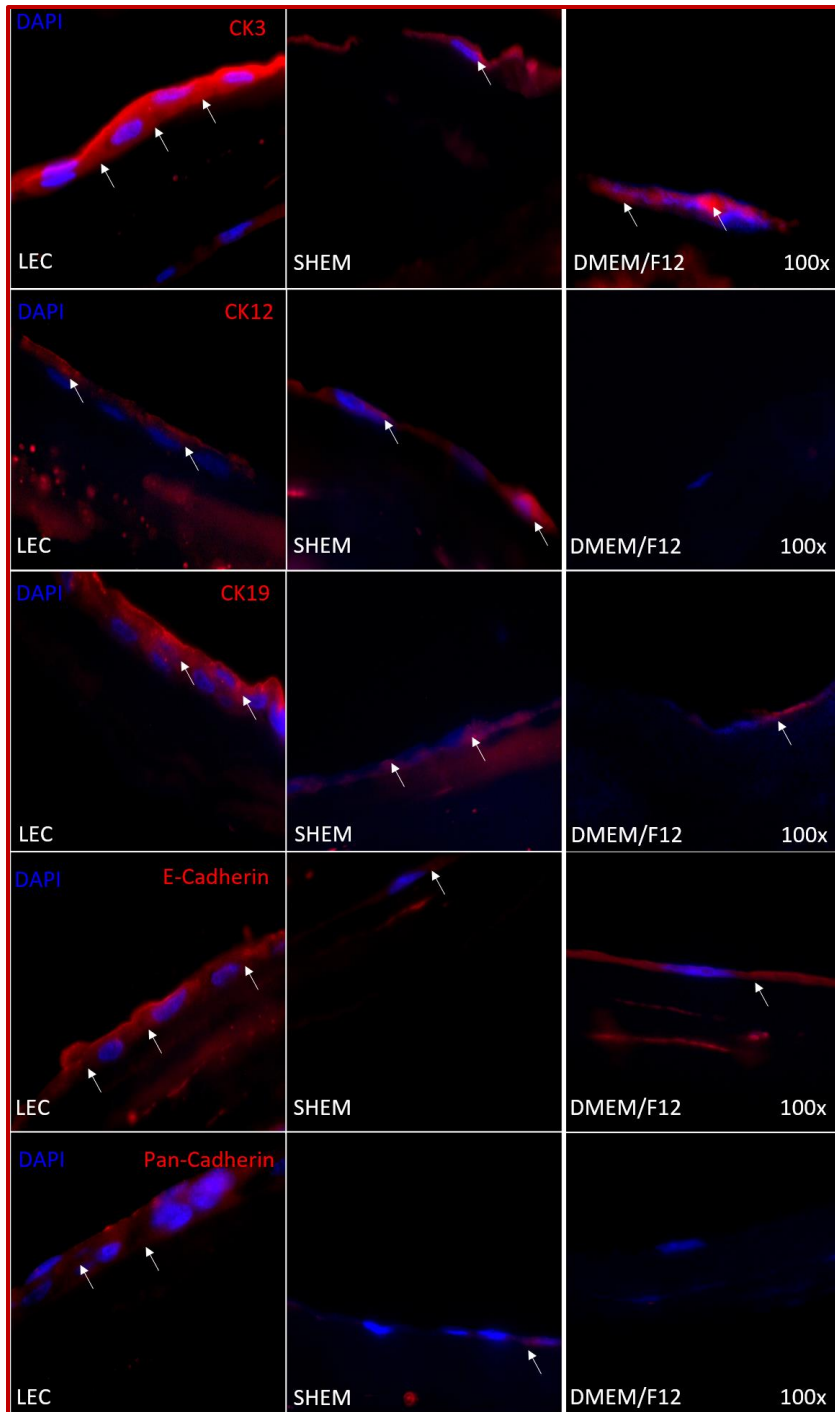


Figura 13 Inmunofluorescencia de la diferenciación epitelial sobre membrana amniótica. La CK3 se encontró muy expresada en todos los grupos. La CK12 estuvo completamente ausente del grupo DMEM/F12, y aunque el grupo SHEM expresó el marcador fue en menor cantidad que el grupo LEC. La CK19 estuvo expresada en todos los grupos, pero comparada con el grupo LEC, la expresión de DMEM/F12 era mucho menor que la de SHEM. Pan-cadherina estuvo ausente del grupo DMEM/F12, y a pesar de que estuvo expresada en SHEM era muy poco y en pocas células. La E-cadherina estuvo expresada en todos los grupos, de manera difusa en DMEM/F12 y SHEM tenía una expresión muy modesta en algunas células y localizada principalmente alrededor del núcleo.

## Discusión

Las hOMSC son células troncales adultas cuyo origen es la cresta neural, presentan los marcadores de células troncales canónicos, pero también presentan los factores de pluripotencia Sox2, Oct3/4 y Nanog, la presencia de estos marcadores, nos pueden explicar su plasticidad, esto es la capacidad de diferenciarse a células de distintas líneas germinales; esto es importante, porque nos indica que tienen ventaja sobre células aisladas de otros sitios, ya que no requieren de inducción a través de otras técnicas como la transfección(8). Estos marcadores no solo controlan el mantenimiento de pluripotencia, en el desarrollo embrionario su ausencia o aumento en ciertas células, las encamina a distintos fenotipos (50). Evaluar las concentraciones de estos marcadores en MSC, nos ayudaría a entender la dificultad o facilidad que tendrán nuestras células para diferenciarse a ciertos linajes. En el caso de nuestro estudio, solo un porcentaje muy bajo del cultivo presento estos marcadores en comparación con estudios previos, que se puede explicar porque las citometrías en pases muy tempranos, cuando estudios se realizaron pases posteriores.

Aunque hay terapias celulares para tratar LESCD con un grado de éxito, estas tienen sus limitaciones y riesgos(23, 45). El trasplante de células del limbo requiere un ojo sano, por lo cual los pacientes con afecciones bilaterales no pueden beneficiarse de esta terapia(26). Incluso pacientes que son candidatos tienen el riesgo de que el trasplante cause la misma afección que se intenta curar. Otra limitación importante es con los pacientes con enfermedades autoinmunes u ojo seco, en los cuales el trasplante suele fallar muy probablemente debido a la inflamación crónica que presentan(26). Las células troncales mesenquimales ya se han propuesto para diferenciación a epitelio corneal(22), por ejemplo de gelatina de Wharton(51), pulpa dental(52) y medula ósea(53), en caso de tener éxito, les darían a los pacientes una opción más de tratamiento.

Comparando nuestros resultados con los encontrados en una revisión realizada por Harkin DG. y cols., en la que discuten la falta de consenso entre distintos estudios por la falta de acuerdo en la forma de medir los resultados de la diferenciación de las células troncales hacia epitelio del limbo- esclero-corneal, proporcionan ciertos

marcadores para describir el fenotipo y lograr una forma de reportar los hallazgos e incrementar la validez de estos; la mayoría de nuestros resultados se ajustaron a los recomendados, que es la expresión de CK3, CK19 y CK12 (23). Sin embargo, la córnea es un tejido complejo, gran parte de la estructura de su epitelio, es el contacto célula-célula, así como con la membrana basal del tejido conjuntivo subyacente, que en los epitelios se da principalmente a través de cadherinas, la expresión de estas proteínas es un paso importante para la futura integridad del injerto en una zona donde se requiere resistencia a fuerzas mecánicas como la fricción (54). En nuestros experimentos pudimos confirmar la presencia de E-cadherina, que es un componente importante en la capa basal de epitelio corneal, y media los contactos célula-célula de esta zona (55). Aunque obtener el fenotipo epitelial es un gran paso para la generación de un injerto corneal, este no estaría completo o tendría la misma capacidad que un trasplante de córnea sin una región con células troncales queratolímbicas (LESC), estas células tienen la capacidad de autorrenovarse y al mismo tiempo mantienen la separación de la córnea y la conjuntiva.

La transdiferenciación (la conversión de un tipo celular diferenciado a otro tipo celular diferenciado) siempre ha sido un tema controversial. Se considera tanto un evento normal en la embriogénesis y reparación, como una parte importante de la reprogramación de células somáticas en células pluripotentes inducidas(56). Se puede obtener tanto con la manipulación genética como con la manipulación del medio ambiente a través de medios enriquecidos. Avances recientes en la transdiferenciación química han incrementado las herramientas para realizar este tipo de experimentos(57, 58). Todas estas herramientas hacen a este estudio solo el primer acercamiento para la aplicación de hOMSC en la ingeniería de tejidos de córnea. La mayoría de los estudios que involucran el uso de MSC para su diferenciación a epitelio corneal utilizan medios enriquecidos u optimizados, esto es porque la principal preocupación es que la manipulación genética de las células ocasione tumores a largo plazo(23, 59). Otro punto importante para el fenotipo epitelial es la mecanotransducción (proceso mediante el cual una célula transmite un estímulo mecánico en una respuesta química), que no solo es un mecanismo celular normal es también una herramienta para la transdiferenciación, para el cual las cadherinas juegan un papel importante, ya que pueden endurecer a la



célula provocando la traslocación de señales al núcleo, que puede hacer o romper el fenotipo epitelial. En córnea es de gran importancia la E-cadherina, y a pesar de que la medimos en nuestro estudio y es positiva su localización en citoplasma previene que nuestras células la usen, lo cual puede ser una razón de la persistencia del fenotipo fibroblastoide de las hOMSC(58, 60-62).

Importante para la ingeniería de tejidos, especialmente córnea, es el andamio utilizado para generar injertos, que permitan a las células mantener su potencial de diferenciación, así como permitir que las células se diferencien a epitelio. Mantener el tipo de epitelio que córnea requiere es un verdadero reto, ya que el potencial del epitelio de mantener o cambiar su fenotipo depende de la suavidad o dureza del tejido de soporte, por ejemplo, el limbo y la córnea central tienen distintos grados de dureza, lo que provoca la migración celular hacia el centro de la córnea durante la migración celular(61, 62). Esta interacción entre estroma y epitelio puede cambiar la diferenciación del epitelio hacia otro epitelio distinto. Cuando el estroma se endurece debido a la inflamación crónica el epitelio puede cambiar de no queratinizado a queratinizado, una de las razones por las cuales se cree los trasplantes de células limbo fallan en pacientes con enfermedades autoinmunes(26, 60, 61). Existen muchas opciones de andamios que se pueden utilizar en oftalmología y la selección es crucial, para el éxito tanto de la diferenciación como del transporte de los injertos hacia el paciente. En nuestro estudio utilizamos membrana amniótica que ya ha sido utilizada para el cultivo de LESC, por sus características, antiinflamatorias, anti-angiogénicas, y antibióticas, y porque es un andamio ideal para el mantenimiento de LESC, por el parecido entre el estroma de córnea y la membrana amniótica. Esta membrana también proporciona señales que promueven la diferenciación epitelial(17, 49, 61). En nuestro estudio la membrana amniótica, permitió la adhesión de hOMSC y al tratamiento con SHEM, la adquisición de un fenotipo epitelioide, observado en las tinciones con H&E.

# Conclusiones

Las hOMSC son células que se pueden obtener de manera sencilla, de pacientes sanos, en un periodo relativamente corto de tiempo, en números suficientes para ser utilizados en tratamientos. Este es otro estudio más donde se confirma que sin importar la edad del paciente del cuál se obtuvieron, su capacidad de proliferación y diferenciación no disminuye. Las hOMSC presentan marcadores de pluripotencia, pero el porcentaje de estos en los cultivos es bajo probablemente porque se realizaron en pases tempranos, no obstante podrían ser incrementados con otro tipo de técnicas de cultivo como cultivos de célula única. Tienen la capacidad para diferenciarse hacia epitelio, ya que presentan marcadores epiteliales incluso antes de ser cultivadas en medios de diferenciación epitelial.

# Perspectivas

Las hOMSC son una línea relativamente nueva de células troncales. A pesar de que se han hecho varios estudios, donde se demuestra su efectividad para diferenciarse, especialmente a líneas derivadas de la cresta neural, todavía nos queda mucho por investigar acerca de ellas.

La participación del circuito de pluripotencia, en la capacidad y limitantes de diferenciación, así como si puede seleccionar las células positivas a estos marcadores y obtener células con una mayor expresión del circuito sin necesidad de transfección.

La inmunomodulación es una gran incógnita en estas células, se ha observado en estudios previos, pero no se conoce el mecanismo de acción.

Muchos estudios acerca de MSC en general, toman pacientes sanos para la obtención de células para experimentación. Se podría intentar la obtención de pacientes con enfermedades sistémicas para evaluar, si se pueden obtener, y si estas tienen la misma capacidad de proliferar y diferenciarse, comparadas contra un paciente sano. Esto es importante, ya que las hOMSC presentan marcadores del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que nos previene de utilizarlas de forma alogénica, y nos permitiría identificar las características de pacientes candidatos a esta terapia.

Existe todavía mucho trabajo que realizar con las hOMSC para poder mejorar la diferenciación epitelial y la calidad de los injertos para que puedan ser utilizados en pacientes.

Ya que en este estudio solo utilizamos inmunofluorescencia, realizar el experimento confirmando la presencia de los marcadores por otros métodos es necesario. Se deben realizar nuevamente los injertos, y analizar mediante RT-qPCR, western blot y/o citometría de flujo. Debido a las características observadas en las hOMSC durante este estudio medir marcadores para LESC, como PAX6, que es considerado el marcador canónico del desarrollo ocular, y su regulador Wnt7a, así como ABCB5 el cuál participa en el desarrollo y reparación de la córnea, y  $\Delta Np63\alpha$  que es una isoforma de p63, la cuál es responsable de la proliferación celular de las LESC. Así como la participación de moléculas importantes para el mantenimiento epitelial como E-cadherina y la vía de señalización en la cual participa (como por ejemplo la traslocación de  $\beta$ -catenina de núcleo a membrana celular).

Antes de poder utilizar esta terapia en pacientes, debemos realizar las pruebas *in vivo*. El modelo mejor establecido se realiza en conejos, en donde una quemadura química, simula con el tiempo la pérdida de LESC y la invasión por la conjuntiva y neovascularización de la córnea, la cual sería reemplazada con nuestro injerto. Esta es la mejor forma de evaluar si nuestro injerto tiene posibilidades de ser utilizado como un reemplazo corneal.

Artículo



Article

# Can Human Oral Mucosa Stem Cells Differentiate to Corneal Epithelia?

Sonia López <sup>1</sup>, Lía Hoz <sup>1</sup> , Eda Patricia Tenorio <sup>2</sup> , Beatriz Buentello <sup>3</sup> , Fátima Sofía Magaña <sup>3</sup> , Ana Wintergerst <sup>1</sup>, Alejandro Navas <sup>3</sup> , Yonathan Garfias <sup>2,3,\*</sup> and Higinio Arzate <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico; sonyletayf@comunidad.unam.mx (S.L.); liahoz@fo.odonto.unam.mx (L.H.); anawintergerst@comunidad.unam.mx (A.W.)

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico; ep.tenorio@unam.mx

<sup>3</sup> Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, CDMX 06800, Mexico; bbuentello@institutodeoftalmologia.org (B.B.); fatima.magana@institutodeoftalmologia.org (F.S.M.); alejandro.navas@institutodeoftalmologia.org (A.N.)

\* Correspondence: yogarfias@institutodeoftalmologia.org (Y.G.); harzate@unam.mx (H.A.)

**Abstract:** Human oral mucosa stem cells (hOMSCs) arise from the neural crest, they can self-renew, proliferate, and differentiate to several cell lines and could represent a good source for application in tissue engineering. Because of their anatomical location, hOMSCs are easy to isolate, have multilineage differentiation capacity and express embryonic stem cells markers such as—Sox2, Oct3/4 and Nanog. We have used SHEM (supplemented hormonal epithelial medium) media and cultured hOMSCs over human amniotic membrane and determined the cell's capacity to differentiate to an epithelial-like phenotype and to express corneal specific epithelial markers—CK3, CK12, CK19, Pan-cadherin and E-cadherin. Our results showed that hOMSCs possess the capacity to attach to the amniotic membrane and express CK3, CK19, Pan-Cadherin and E-Cadherin without induction with SHEM media and expressed CK12 or changed the expression pattern of E-Cadherin to a punctual-like feature when treated with SHEM media. The results observed in this study show that hOMSCs possess the potential to differentiate toward epithelial cells. In conclusion, our results revealed that hOMSCs readily express markers for corneal determination and could provide the ophthalmology field with a therapeutic alternative for tissue engineering to achieve corneal replacement when compared with other techniques. Nevertheless, further studies are needed to develop a predictable therapeutic alternative for cornea replacement.

**Keywords:** stem cells; cornea; epithelial differentiation; oral mucosa



**Citation:** López, S.; Hoz, L.; Tenorio, E.P.; Buentello, B.; Magaña, F.S.; Wintergerst, A.; Navas, A.; Garfias, Y.; Arzate, H. Can Human Oral Mucosa Stem Cells Differentiate to Corneal Epithelia? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5976. <https://doi.org/10.3390/ijms22115976>

Academic Editor: Philip W. Wertz

Received: 14 April 2021

Accepted: 28 May 2021

Published: 1 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Stem cells have three main characteristics—they can self-renew, proliferate and differentiate to several cell phenotypes [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are a fraction of adult cells that have the capacity to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes, and they possess specific immune profiles. MSC canonical profiles must be positive to surface markers CD73, CD90 and CD105, and lack hematopoietic and endothelial markers like CD31, CD34 and CD45 [2,3]; these markers have been challenged in recent years because they are mostly specific to bone marrow-derived cells, but some of the markers identify most MSCs on any tissue in a perivascular niche, where they are usually found independently of their origin [3]. Mesenchymal tissues from the head and neck are special, in the sense that most of them derive from a mix of the neural crest (NC) and mesoderm, making it possible to obtain stem cells derived from NC that have the potential to form tissues from the region that they were originally isolated as well as tissues from other sites [4]. The oral cavity is easy to access and stem cells can be isolated from several sites

such as—bone marrow, dental pulp of permanent and deciduous teeth, dental follicle, dental germ, apical papilla, oral mucosa, periosteum, periodontal ligament, salivary glands, and adipose tissues [5,6]. Of these sites, the oral mucosa is privileged since it can regenerate quickly and ages slowly in comparison to other tissues in the body. Both the epithelia and the lamina propria have different stem cells that represent important candidates for stem cell therapies [7]. A special population of stem cells from the lamina propria of the human oral mucosa (hOMSCs) is easily isolated and possesses great potential for differentiation. These cells express embryonic stem cell (ESC) markers; Tra2-49, Tra2-54, SSEA4, Oct4, Sox2 and Nanog, and the NC marker; nestin, besides the canonical MSC markers CD73, CD90, CD105 [8]. In vitro, they can differentiate into tissues of the three germ layers, and in vivo they form bilinear teratomas. These cells have been found to differentiate into NC lineages such as—astrocytes, dopaminergic neurons, cardiomyocytes, and osteoblasts [8–13].

Ophthalmology could benefit from tissue engineering. Corneal transplantation is the most frequently performed type of transplant worldwide, coming second only to kidney. In México it represented 54.2% of all transplant activity in 2019 [14].

The cornea forms part of the anterior ocular surface of the eye. It is a transparent and avascular tissue consisting of three cellular layers (epithelial, stroma and endothelial) and two acellular layers (Bowman membrane and Descemet membrane). The corneal epithelium comprises 10% of the total corneal thickness, absorbs nutrients and oxygen, while protecting the eye. The epithelium is squamous and non-keratinized with up to 5–6 layers, and composed of basal cells, wing cells as well as superficial cells [15]. The periphery with the conjunctiva is delimited by the limbus, which houses a unique population of cells called limbal epithelial stem cells (LESC) which renew the cornea epithelium [16,17]. The lack of these cells is called limbal epithelial stem cell deficiency (LESCD) and causes vascularization and opacification of the cornea. This deficiency elicits loss of eyesight. The etiology of LESCD can be—(1) congenital (aniridia, sclerocornea); (2) diseases with an extrinsic origin or trauma (chemical and thermal burns); (3) systemic diseases; and (4) idiopathic [18]. An autologous limbus transplant can help repair the cornea, but it has the risk of causing LESCD on the donating eye. Moreover, this option is applicable for people with only one eye damaged, and it does not have good results in people with an autoimmune disease. Another option is the allogenic transplant, which, beside complications like rejection, also faces lack of donors [19–21].

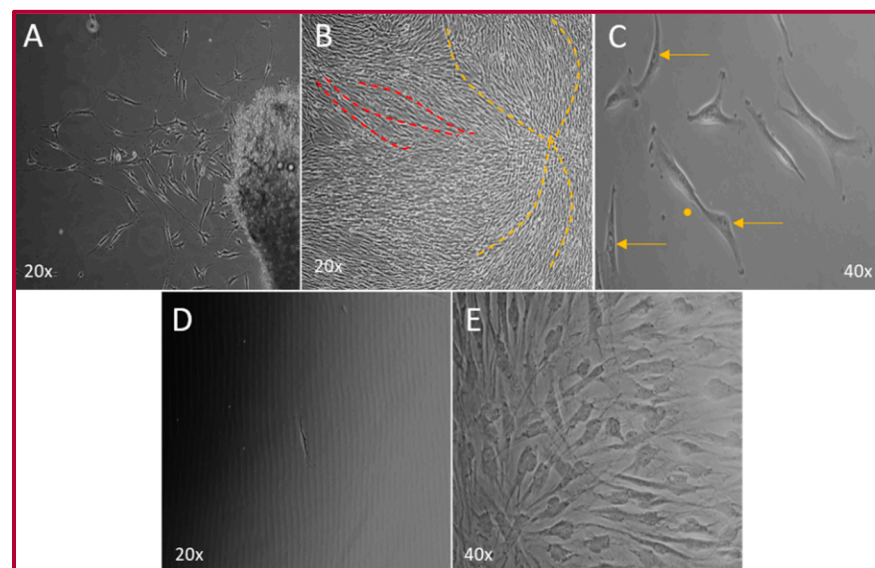
Using MSCs to replace cornea epithelia has been proposed [22,23]. The main limitations, however, are the cell source and their difficulty to transdifferentiate into epithelial cells. Because hOMSCs originate in the neural crest and have shown greater differentiation potential, we hypothesized that they have the ability to transdifferentiate into epithelia.

To facilitate the manipulation and transplant of the differentiated cells to the eye, we selected a scaffold that has been used in ophthalmology—the amniotic membrane. This membrane has been used to as an alternate therapy for superficial eye diseases when a cornea donor is not available or as a scaffold for LESCD with success; it facilitates epithelial cell migration because of its structure. Its stroma is similar to the cornea stroma, providing good biocompatibility and possesses anti-angiogenic, antibiotic, and anti-inflammatory properties [24,25].

## 2. Results

### 2.1. Isolation of the hOMSCs

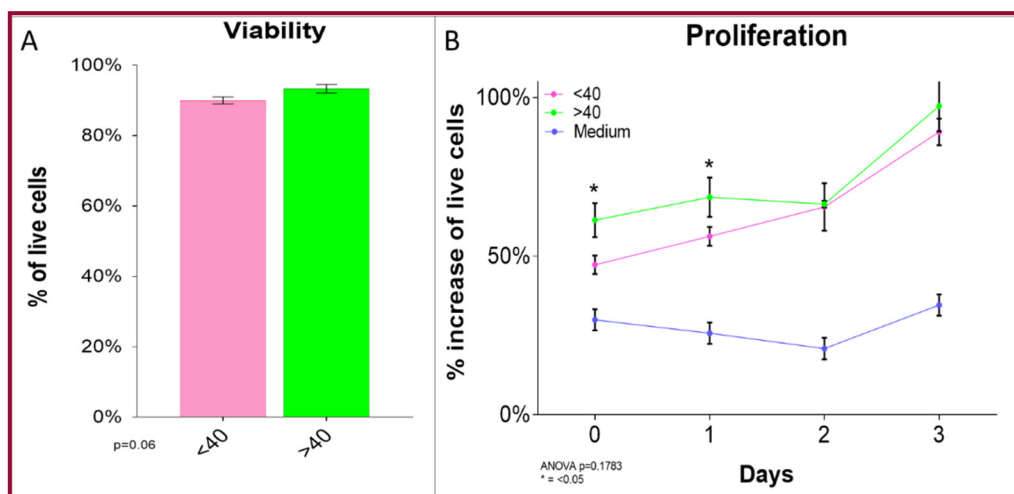
The primary culture was established in approximately 31 days, after obtaining 1.4 cm<sup>3</sup> tissue samples (Figure S1). The cells showed a fibroblast-like shape with central nuclei and a prominent nucleolus, with some cells in mitosis. When hOMSCs reached 90–100% confluence, cells started forming short currents and storiform (whirlpool) patterns. These cells also exhibited the capacity to form colonies from a single cell (Figure 1).



**Figure 1.** hOMSC culture. (A) Explant of oral mucosa, where cells can be observed migrating outward from the tissue fragment. (B) Cell culture at 90–100% confluence grouped in small currents (red lines) and in storiform pattern (yellow lines). (C) Individual cells, showing central nucleus with prominent nucleolus (yellow arrows). (D) Single cell culture at day 1. (E) Colony of cells showing a homogeneous morphologic phenotype.

## 2.2. Cellular Characterization of hOMSCs

Cellular number, viability and proliferation were determined by grouping the cells into two age groups from patients—either younger or older than 40. Our results revealed that hOMSCs from older patients show no differences with those from younger patients. No significant differences were observed in the number of cells or their viability among the groups ( $p = 0.06$ ). There was a slight difference in the proliferation between both groups at day one of the culture, but there were no significant differences between groups at the end of the assay ( $p = 0.1763$ ) (Figure 2).

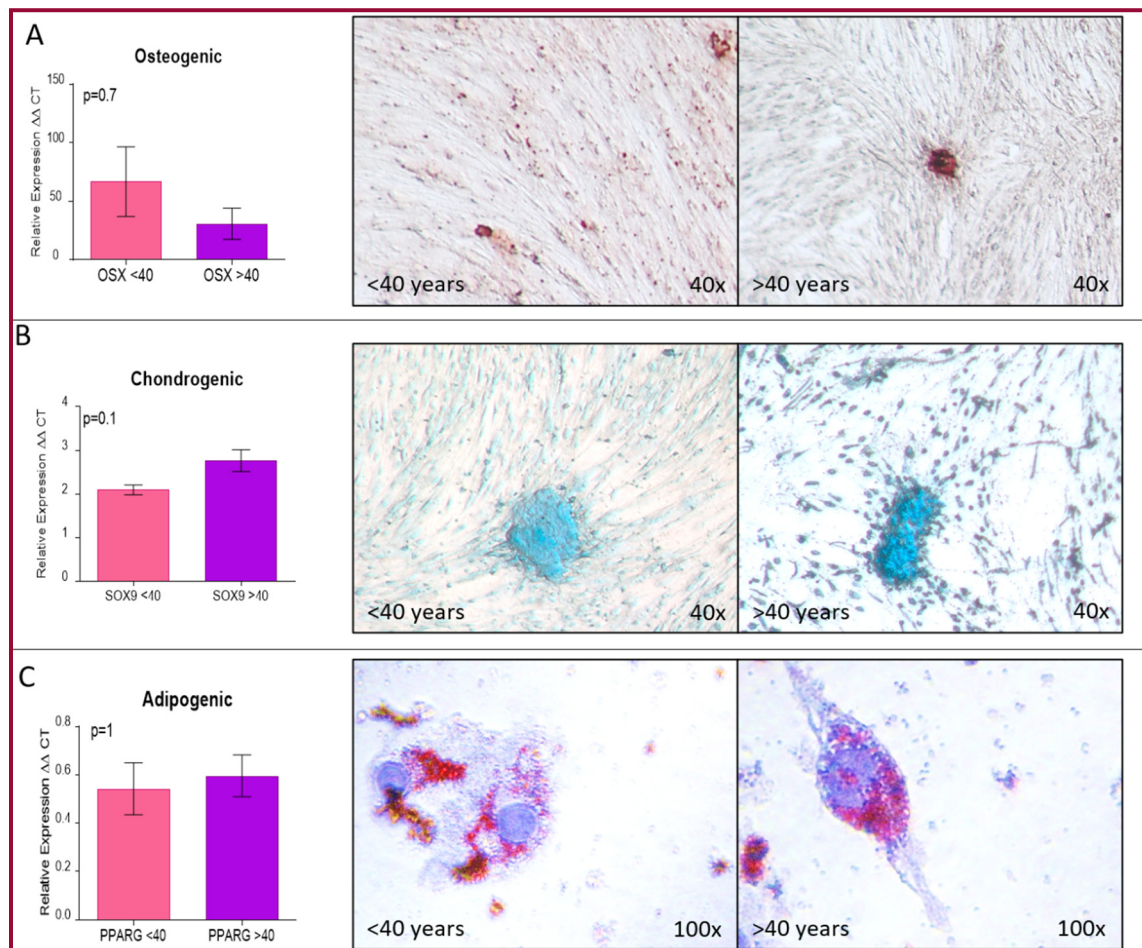


**Figure 2.** Comparison of hOMSCs among age groups. In samples obtained from healthy donors, (A) viability was over 90% for both age groups (<40 years old and >40 years old) with no significant difference between them. (B) In the proliferation assay, there was a slight difference on day one, but at day 3, there were no differences between age groups (<40 years old and >40 years old). (Bars represent mean  $\pm$  SEM),  $p < 0.05$  was considered significant,  $n = 3$  per group).

The same groups were used to confirm if there was any variation in their differentiation towards mesenchymal phenotypes—chondrogenic, osteogenic and adipogenic, in both



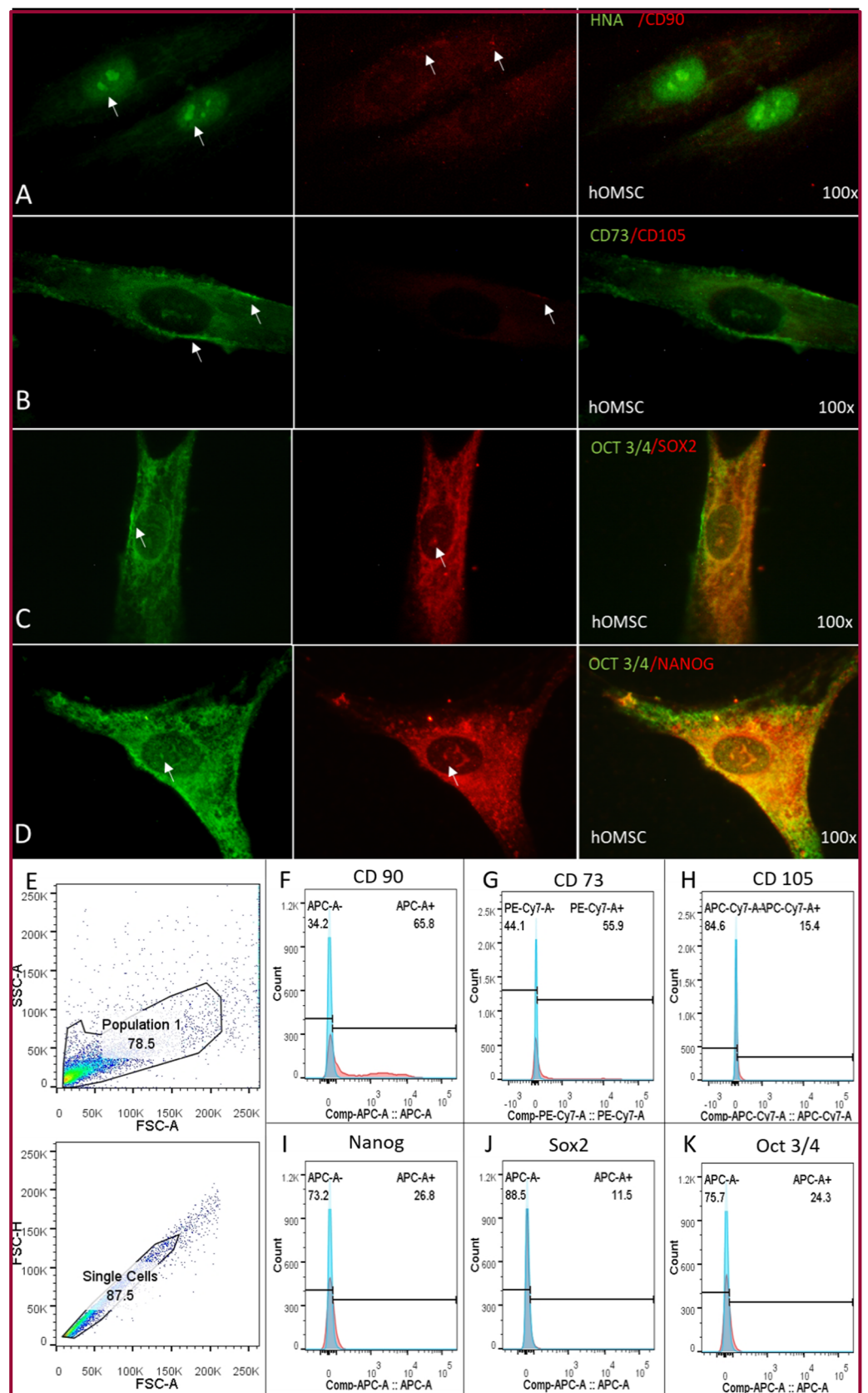
cell populations. To confirm differentiation into these phenotypes, we used special stains specific for each one (alizarin red, alcian blue and oil red O) as well as RT-qPCR as markers that identify each one of them (Sox9, OSX, and PPAR $\gamma$ ). The assays confirmed that both groups could differentiate into each phenotype, and more importantly that there were no significant differences between them (Figure 3). Since these two assays revealed that there are no differences between the groups, all further assays were performed randomly from passages one to four.



**Figure 3.** Comparison of hOMSC mesenchymal differentiation among age groups. **(A)** Osteogenic. Both age groups (<40 years old and >40 years old) showed an increase in OSX mRNA, a bone marker for osteoblasts as well as positive staining with alizarin red. **(B)** Chondrogenic. Both age groups (<40 years old and >40 years old) had an increased expression of Sox9 mRNA, a marker of chondrocytes and positive staining to alcian blue. **(C)** Although, there was no increase in PPAR $\gamma$  mRNA, a marker of adipocyte differentiation, the cells showed lipid vesicles stained with oil red O. (Bars represent mean  $\pm$  SEM),  $p < 0.05$  was the cut off for significance,  $n = 3$  per group).

The flow cytometry assay demonstrated the presence of mesenchymal stem cell markers—CD90, 65.8%; CD73, 55.9%; CD105, 11.5%; Nanog, 26.8%; Sox2 11.5% and Oct3/4 24.3% of the hOMSC culture. These markers were further confirmed by immunofluorescence. The localization of the markers was identified as follows—CD90 was present in the cytoplasm but the expression was low, CD73 was strongly expressed in the cell membrane, CD105 was weakly expressed in the cell membrane, Nanog, Oct3/4 and Sox2 were strongly expressed perinuclearly and inside the nucleus (Figure 4).

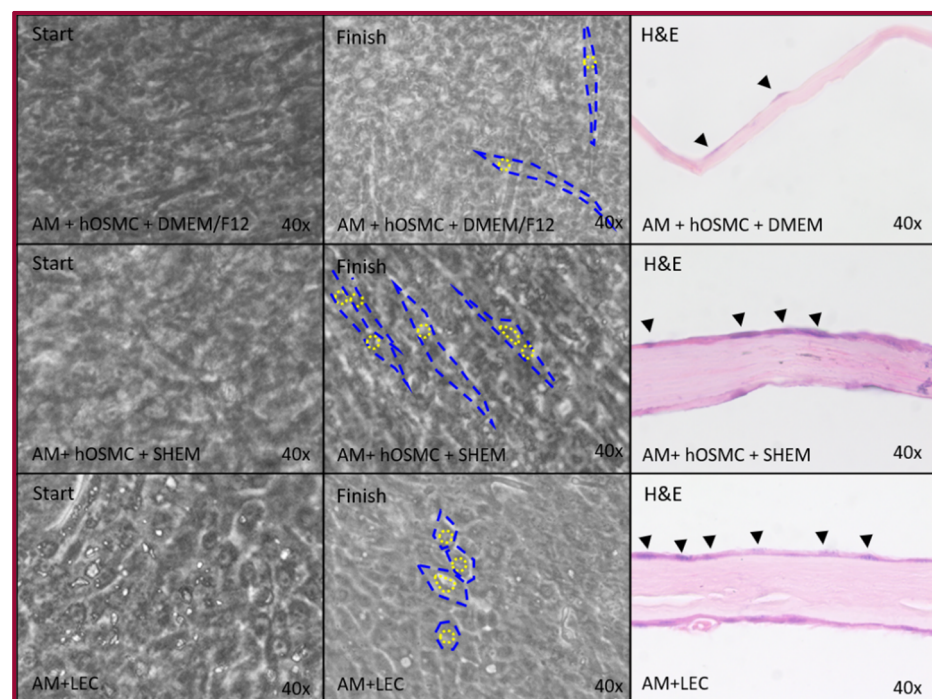




**Figure 4.** hOMSC characterization. (A–D) Immunofluorescence of hOMSCs and pluripotency markers. White arrows mark areas of positivity. (E) Flow cytometry gates. Percentage of positive cells in culture for hOMSCs—(F) CD90 65.8%, (G) CD73 55.9%, (H) CD105 15.4% and pluripotency markers—(I) Nanog 26.8%, (J) Sox2 11.5% and (K) Oct3/4, 24.3%.

### 2.3. Epithelial Differentiation

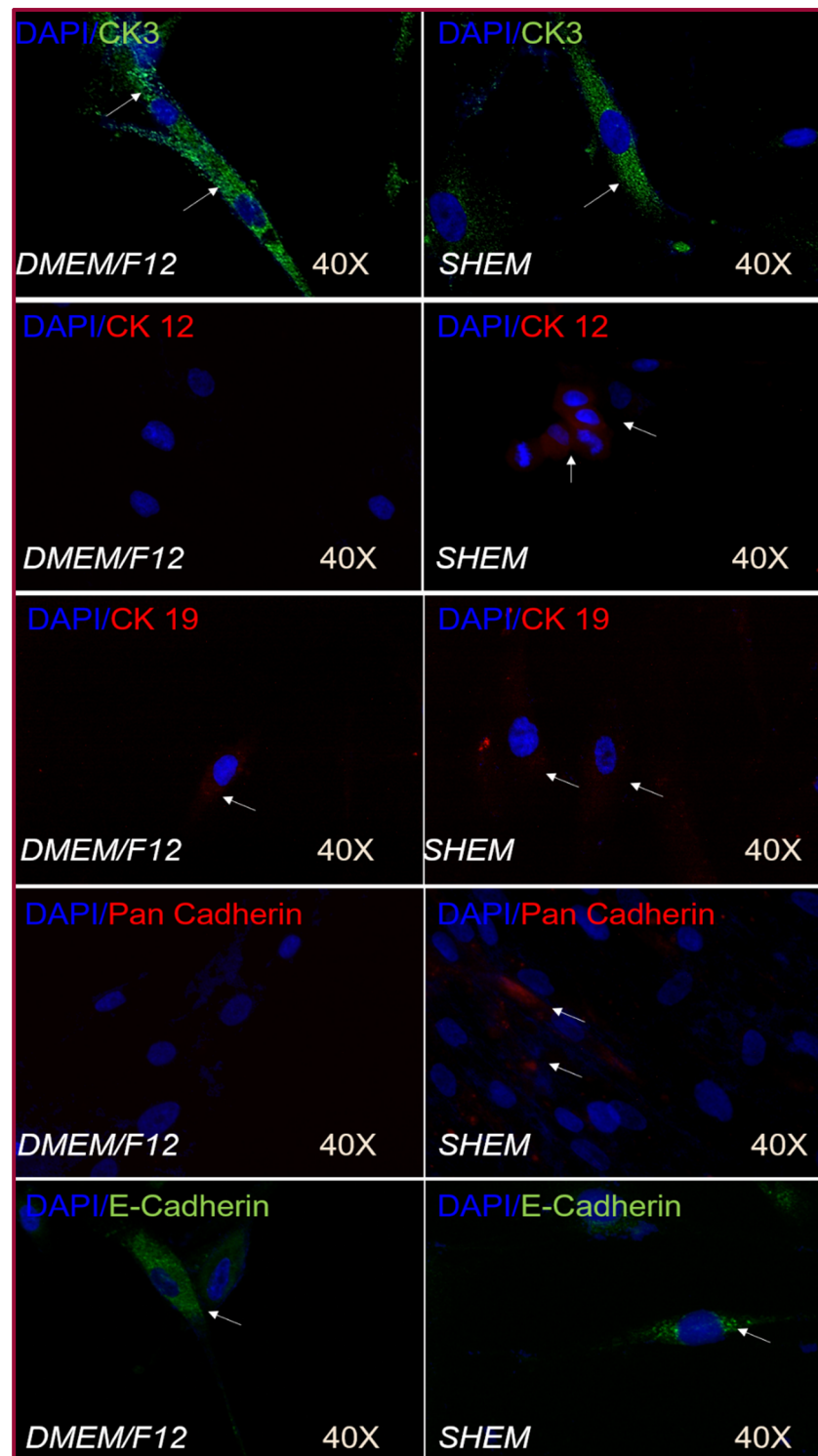
Limbal epithelial cells (LECs) were used as a positive control. When LECs are expanded over amniotic membrane and they preserve their epithelial morphology—polygonal cells with a central nucleus and a cytoplasm with a nucleus ratio of 1:1. They were observed as rectangular cells with a central nucleus and abundant cytoplasm in the histological slides. hOMSCs were cultured over the amniotic membrane using the maintenance medium as a negative control. These cells have an elongated morphology, with a nucleus that can be in the middle of the cell or to one of the sides with a cytoplasm–nucleus ratio of approximately 3:1. The histological assessment revealed that the nucleus can be found over the amniotic membrane, and that there is almost no cytoplasm. In contrast, in the experimental group where hOMSCs were cultured over the amniotic membrane using the SHEM medium, which is the maintenance media for LEC, these cells preserved the elongated aspect of hOMSCs, but they were more organized and apparently had an increase in the cytoplasm–nucleus ratio. The cells were rectangular with an increased cytoplasm (Figure 5).



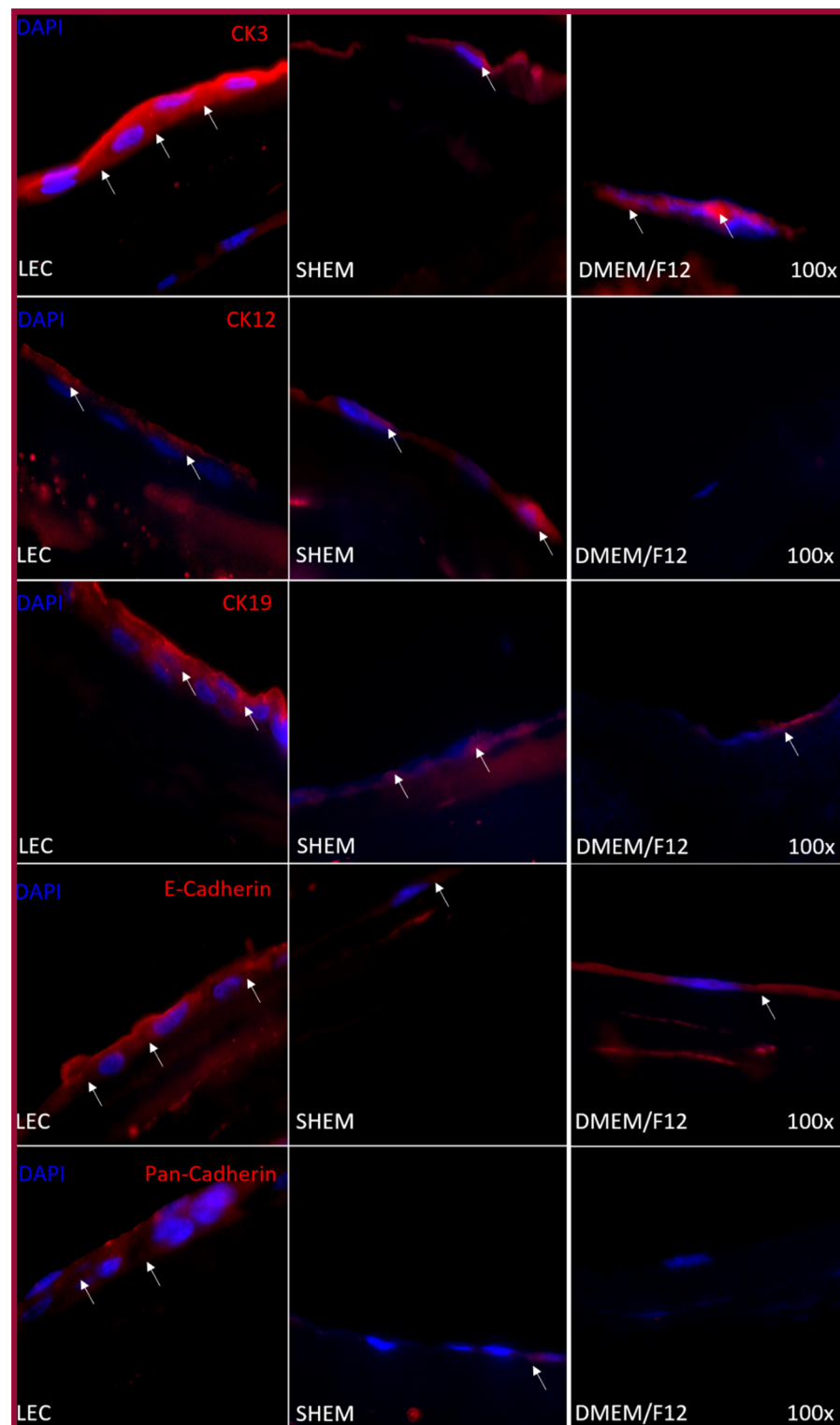
**Figure 5.** hOMSC epithelial differentiation. Comparison from the three conditions during the culture period and H&E staining yielded differences between groups. The culture with maintenance medium retained its fibroblast-like appearance with a prominent nucleus (black arrowhead) but almost no cytoplasm (AM + hOMSCs + DMEM/F12). The LEC line used as an epithelial control exhibited usual epithelial features—small, polygonal with a central nucleus and a 1:1 nucleus–cytoplasm ratio (AM + LEC). The experimental group displayed a fibroblast-like appearance with a prominent nucleus (black arrowhead); however, it was organized in palisades in the culture and showed an increase cytoplasm to nucleus ratio as observed in the H&E slides (AM + hOMSCs + SHEM). AM, amniotic membrane; hOMSCs, human oral mucosa stem cells; SHEM, supplemental hormonal epithelial medium; DMEM/F12, Dulbecco’s modified eagle medium/Ham’s F12.

Immunofluorescence was performed on hOMSCs cultured on coverslips and hOMSCs and LECs cultured on the amniotic membrane. hOMSCs cultured on coverslips using SHEM and maintenance medium were positive to CK3, CK19 and E-cad. They acquired CK12 and Pan-cad only when they were cultured with SHEM medium (Figure 6). The cells cultured on the amniotic membrane exhibited a similar expression pattern; LECs and hOMSCs cultured with SHEM and maintenance media were positive to CK3, CK19 and

E-cad; acquired CK12 and Pan-cad were only expressed when cultured with SHEM media (Figure 7).



**Figure 6.** Epithelial markers—cell culture without AM. SHAM and DMEM/F12 groups presented intense positivity to CK3 in the cytoplasm (white arrows). The positivity to CK19 in both groups was low and localized in the cytoplasm (white arrows). E-cadherin was present in both groups, but the main difference was that DMEM/F12 medium showed diffuse cytoplasmic localization, but SHEM showed punctual localization in the cytoplasm (white arrows). hOMSCs cultured with SHEM expressed CK12 and Pan-cadherin (white arrows).



**Figure 7.** Epithelial marker expression with AM. Cytokeratin-3 was highly expressed in both groups when compared to the positive control (LEC). Cytokeratin-12 was completely absent in the DMEM/F12 group, and although the SHEM group expressed the marker, its expression was lower than with LEC. Cytokeratin-19 was expressed in all groups, but when compared to LEC, the expression in the DMEM/F12 group was lower than in the SHEM group. Pan-Cadherin was absent from the DMEM/F12 group and even though the SHEM group expressed the marker it was very modest in scattered cells. E-cadherin was expressed by all groups, but it was scattered in the cytoplasm of the cells in the DMEM/F12. The SHEM group positivity was mainly localized in the periphery of the nucleus.



### 3. Discussion

Human oral mucosa stem cells are adult stem cells originating from the neural crest [26]. These cells express ESC markers such as Nanog, Sox2 and Oct3/4, which explain the plasticity observed in these cells. These markers are not just important markers of plasticity. However, the differences in expression levels can also be used to track the capacity to differentiate into specific phenotypes [27–30]; therefore, in the case of eyes, cells positive to Sox2 and Pax6 (which act in a synergic manner to drive corneal differentiation in embryogenesis) might have a better chance of acquiring a corneal phenotype [31]. All this is important since they have advantages over cells isolated from other sites of the body and explains the capacity of these cells to differentiate into cell lineages outside their tissue of origin. This, as well as the fact that they are isolated from the lamina propria of the oral mucosa using local anesthesia and that age does not affect their viability, proliferation or differentiation, makes them good candidates to be used in tissue engineering since they do not require long periods for maintenance or prior storage [8].

Although there are cell-based therapies to treat LESCD with a certain success, it has limitations and risks. These therapies need a healthy eye to obtain the cells, therefore, patients with bilateral problems cannot be benefited. Even in patients that are candidates for this therapy, the risk of causing LESCD in the donor eye is high. Another limitation of this therapy relates to patients with autoimmune or dry eye diseases, since this therapy may not be successful in this type of patient, very likely because of the chronic inflammatory processes affecting the eye [23,32–34]. Mesenchymal stem cells have already been proposed to treat LESCD, and avoid harm to healthy eyes, thus giving patients with bilateral disease another option for treatment [22].

The results observed in this study show that hOMSCs possess the potential to differentiate toward epithelial cells. However, there is no consensus on how experiments to confirm cells' capacity to transdifferentiate to epithelial cells should be analyzed. These cells express CK3, CK12 and CK19, which are markers associated with corneal epithelial cells [23]. The cornea is a complex tissue in which cell-to-cell contact plays a central role in keeping its structure. This contact is mainly mediated by E-cadherin, and even though hOMSC cells expressed this marker, the proper localization that will provide the graft with the needed resistance *in vivo* must be confirmed in subsequent studies [35–37]. Although obtaining an epithelial phenotype is a big step towards the generation of a corneal graft, it would not be complete without an LESC zone. These cells have self-renewal capacity and at the same time maintain the corneal structure by preserving the separation between the corneal space and the conjunctiva. Given the characteristics present in hOMSCs, a possible direction could be determining markers such as Pax6, which is the canonical marker for ocular development, as well as its regulator Wnt7a. Another important marker is ABCB5, which is present during the development and repair of the cornea, along with  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , which is an isoform of p63, which is responsible for the LESC proliferation [23,38–41].

Trans-differentiation (the conversion of a differentiated cell type to another differentiated cell type) has always been a controversial subject. It is considered both a normal event in embryogenesis and repair, and a part of the reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells [42]. Trans-differentiation can be achieved either by gene manipulation or handling the cell culture environment through enriched media. Recently, advances in the field of chemical trans-differentiation have been reported, giving to the field of tissue engineering multiple tools to work with [43,44]. This study shows the first approach towards application of hOMSCs for cornea tissue engineering. Most studies involving differentiation of MSCs towards cornea epithelium have used enriched media optimized for epithelium, however, the main concern of using genetic reprogramming is the appearance of a tumor in the short- or long-term after the therapy has been applied [23,43]. Epithelium mechano-transduction is also a trans-differentiation tool, where cadherins play an important role, since they can stiffen the cell, therefore provoking signals to transduce into the nucleus, influencing the epithelial phenotype. In our study, E-cadherin showed positivity. Nevertheless, is not localized in the cell membrane, and consequently, it neutral-

izes the cell to receive signals that will help express the epithelial phenotype. Nonetheless, future studies to determine the specific role of E-cadherin in the trans-differentiation of hOMSCs into epithelial cells should be performed [34,45–47].

Important for tissue engineering, especially for the cornea, is the scaffold used to generate a graft that will allow cells to maintain their differentiation potential as epithelial stem cells as well as to differentiate into the specific epithelia in cornea—a non-keratinized stratified squamous epithelium. This is a real challenge given that part of the differentiation potential of epithelial cells comes from the stiffness or softness of their environment. The stroma under the limbus is softer than the stroma under the differentiated cornea epithelium, which in part drives the replacement of the epithelium from the limbus to the central cornea [46,47]. The interaction with the stroma in epithelia is important because it can also drive differentiation towards other types of epithelia. Stiffer stroma caused by chronic inflammation may drive LESC to express cytokeratins related to keratinized epithelium, which would be undesirable for corneal grafts, and has been observed when treating LESC with LESC grafts, with grafts tending to fail in people with autoimmune diseases [24,34,47].

The amniotic membrane has been used with and without LESC culture because it presents anti-inflammatory, antiangiogenic, and antibiotic characteristics; it is also an ideal scaffold for LESC. The amniotic membrane and cornea also share similarities in their structure. This membrane also provides cells with specific signals that promote epithelial differentiation [17,48,49]. In our study, the amniotic membrane allowed hOMSCs to adhere and when treated with SLEM medium, acquire an epithelial-like phenotype, as observed in hematoxylin and eosin-stained slides.

In conclusion, the use of MSCs for corneal replacement therapies yields controversial results [50]. Our study demonstrates that hOMSCs readily express markers of corneal determination and, when cultured under specific conditions, they express the molecular markers that are lacking, although more experiments and tests are needed to elucidate their true potential and limitations (this study's greatest limitation is the use of microscopic observation only, and more analysis is needed like flow cytometry and western blot, to confirm the expression of epithelial-related molecules) and must be compared in efficiency and success with other techniques. Our results show that hOMSCs possess the therapeutic potential for cornea replacement.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Culture Media

#### Transport Media

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), antibiotics 3× (300 µg/mL streptomycin and 300 IU/mL penicillin, gentamicin 150-µg/mL, amphotericin B 3.75-µg/mL), sodium pyruvate 10 mM and 1:10 MEM non-essential amino acids 100×—Glycine, L-Alanine, L-Asparagine, L-Aspartic acid, L-Glutamic Acid, L-Proline, L-Serine 10 mM. Maintenance medium (DMEM)—DMEM, 5% to 20% of fetal bovine serum (FBS) of and antibiotics 1× (100 µg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin, gentamicin 100 µg/mL, amphotericin B 2.5 µg/mL), sodium pyruvate 10 mM and 1:10 MEM non-essential amino acids 100×. Adipogenic medium—DMEM, SFB 10% antibiotics 1×, sodium pyruvate 10 mM, 1:10 MEM non-essential amino acids 100×, 0.5 mM isobutyl-methyl-xanthin, 0.5 mM indomethacin, 1 mM dexamethasone. Chondrogenic medium—DMEM, FBS 2%, antibiotics 1×, sodium pyruvate 10 mM, 1:10 MEM, 1 µg/mL of ascorbic acid, ITS-G 1 mL of stock at 100× (0.1721 mM Insulin, 0.0068 mM Transferrin, 0.0038 mM Sodium Selenite) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), 10<sup>-8</sup>M dexamethasone and 10 ng/mL hr-TGF (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico). Osteogenic medium—DMEM, FBS 10% antibiotics 1×, 10 mM sodium pyruvate, 1:10 MEM non-essential amino acids 100×, 10 mM β-Glycerophosphate, 50 µg/mL ascorbic acid and 10<sup>-8</sup>M dexamethasone. Maintenance medium 2 (DMEM/F12)—DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1:1 with Medium Ham 12), FBS at 5% or 10%, antibiotics 0.5× (50 µg/mL streptomycin and 50 IU/mL penicillin, gentamicin 50 µg/mL, amphotericin

B 1.25 µg/mL), 10 mM sodium pyruvate and 1:10 MEM non-essential amino acids 100×. Epithelial Maintenance and Differentiation (SHEM)—DMEM/F12, FBS at 5%, antibiotics 0.5×, 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), hEGF 2 ng/mL (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), ITS (Insulin 5 µg/mL, Transferrin 5 µg/mL, Sodium Selenite 5 ng/mL) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico), hydrocortisone 0.5 µg/mL, cholera toxin A (TCA) (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico) 30 ng/mL. Media reagents unless otherwise stated were obtained from Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico).

#### 4.2. hOMSCs Isolation

Oral mucosa was obtained from 14 healthy patients (19–68 years) that required a third molar surgery. The project was approved by the Ethics Committee of the School of Dentistry of the Universidad Nacional Autónoma de México (CIE/0303/02/2018) and informed consent was obtained from the participants. Samples were washed thoroughly with DMEM media supplemented with antibiotics as described above, macerated, and placed in a solution of dispase II 2 mg/mL and type III collagenase 2 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico) for 2 h at 37 °C. They were vortexed every 15 min and placed on 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. Media were changed every other day until reaching 90% confluence and then replated on 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. Single cell cultures were also performed to test the clonogenic capacity of the cells. Passages 2 through 7 were used for the experiments. To increase the cell number prior to the experiments, the cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks in the corresponding maintenance media. Cultures were kept at 37 °C, with an atmosphere of 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub> and 100% humidity.

#### 4.3. Limbal Epithelial Cells

Corneoscleral rims were obtained from cadaveric donor corneas. They were washed with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS). The iris, conjunctiva and endothelium were removed. The rims were placed in dispase II 2 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico) for 40 min at 37 °C, washed with PBS and cut in fragments of approximately 2 mm. These fragments were cultured directly over the amniotic membrane with the epithelia side up; one drop of fetal bovine serum (FBS) was placed over the fragment for 8 h and then the epithelial medium was added.

#### 4.4. Cellular Characterization

##### 4.4.1. Cell Number and Viability

hOMSCs at passage 2 from every subject were cultured up to 90% confluency in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks. They were trypsinized with trypsin 0.25%-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico) for 2 min at 37 °C, de-attached and then centrifuged, washed, and placed on 1 mL of serum-free media. Cells were counted using 10 µL of cell solution and 10 µL of tripan blue in a countess device (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) according to the manufacturer's recommendations. The number of live and dead cells as well as viability were determined. Results are expressed as the mean ± SD (<40 years vs. >40 years).

##### 4.4.2. Cell Proliferation

Cell Proliferation was determined using the Presto Blue Kit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) following the manufacturer's instructions. On a 96-well plate, 5 × 10<sup>3</sup> cells/well were plated, kept for 24 h to allow attachment. Maintenance medium was collected, and the cells were placed on a mix of 90 µL with 10 µL Presto Blue reactive and incubated at 37 °C 5% CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub> and 100% humidity. After 2 h, two measures (A<sub>570</sub> and A<sub>600</sub>) were taken at 24, 48, 72 and 96 h according to the manufacturer's instructions. Wells without cells were used as a negative control; the value of these wells was subtracted from the wells with cells. Results are expressed as the mean ± SD (<40 years vs. >40 years).

#### 4.4.3. Mesenchymal Differentiation

Six/well plates were used for each phenotype;  $1 \times 10^4$  cells/well were plated and left overnight to attach, then cultured with osteogenic, chondrogenic or adipogenic differentiation media for 21 days. Two wells of each plate were fixed with PFA and stained with 2% alizarin red, alcian blue, and oil red O.

#### 4.4.4. RT-qPCR

Total RNAs were extracted according to the manufacturer's recommended protocols with Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified with a Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Ten nanograms were used per reaction and the level of mRNA expression was quantified by the one-step real-time RT-PCR method using a SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green One-Step qPCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A 25- $\mu$ L reaction was set up with the following PCR conditions—(cDNA synthesis) 50 °C for 3 min, denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and finally 40 °C for 1 min. Amplifications were performed in a Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Valencia, CA, USA). All experiments were performed in triplicate and expression levels were obtained using minus delta-delta Ct method normalizing for GAPDH. Primer sequences are reported in Table 1.

**Table 1.** Primer Sequences for RT-qPCR.

Gene		Sequence 5'-3'	Size (nt)	Tm (°C)
SOX9	F	GTA ATC CGG GTG GTC CTT CT	20	58.8
	R	GAC GCT GGG CAA GCT CT	17	59.68
OSX	F	GCC AGA AGC TGT GAA ACC TC	20	59.12
	R	GCT GCA AGC TCT CCA TAA CC	20	58.98
PPAR- $\gamma$	F	GAG AGA TCC ACG GAG CTG AT	20	58.67
	R	AGG CCA TTT TGT CAA ACG AG	20	56.91
GAPDH	F	CAACGGATTGGTCGTATTGG	21	59.4
	R	GCAACAATATCCACTTTACCAAGAGTTAA	29	59.5

#### 4.4.5. Immunofluorescence

Cells ( $1 \times 10^3$ ) were plated and left to adhere in 12 mm coverslips previously coated with Poly Lysine-L for 24 h; then washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) for 20 min and then washed twice with PBS. They were incubated in a humid chamber with a 1:50 dilution of the primary antibodies—CD105 (goat anti-human), CD90 (goat anti-human); Sox2 (rabbit anti-human), Nanog (rabbit anti-human); Oct3/4 (mouse anti-human), CD73 (mouse anti-human) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), HNA (mouse anti-human) (Abcam PLC, Cambridge, UK) in BSA 1%. Coverslips were incubated at 4 °C overnight, washed twice with PBST (PBS + 0.1% Tween20) and twice with PBS. Secondary antibodies were diluted 1:100 (goat anti-mouse FITC), 1:400 (goat anti-rabbit-Alexa 546), and 1:400 (rabbit anti-goat-Texas Red) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and then incubated at room temperature for 2 h, washed 1 $\times$  with PBST and 2 $\times$  with PBS. They were mounted on slides using glycerol diluted in PBS (1:2). Negative controls were performed using secondary antibodies in the absence of the primary antibody (Figure S2).

#### 4.4.6. Flow Cytometry

hOMSCs were trypsinized with Trypsin-EDTA 0.25%, washed and counted. We used  $2 \times 10^5$  for each marker. Two protocols were used—for the superficial markers CD73-PeVio770 (clone REA804), CD90-APC (clone REA897), CD105-APCVio770 (clone REA794) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) hOMSCs were washed in cold buffer (PBS + BSA 0.5% + EDTA 2 mM), antibodies were diluted 1:50 in the same buffer and incubated for 30 min at 4 °C in a dark environment, they were then washed in cold



buffer and fixed using 1% PFA for 10 min, washed and resuspended in cold PBS. For the intracellular markers Nanog-APC (clone REA314), Oct3/4-APC (clone REA622) and Sox2-APC (clone REA320) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), a stain kit FOXP3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was used as recommended by the manufacturer. The cells were suspended in the permeabilization/fixation buffer for 30 min at 4 °C in darkness, washed with cold buffer and washed again twice with permeabilization buffer. The cells were resuspended again in 100 µl of permeabilization buffer with 10 µl of antibody and incubated for 30 min at 4 °C in a dark environment, then washed twice in permeabilization buffer and once with cold buffer and at last in PBS. They were read immediately using a BD flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

#### 4.5. Epithelial Differentiation

##### 4.5.1. Epithelial Differentiation

Three amniotic membranes were obtained from the Amniotic Tissue Bank of the Insitute of Ophthalmology Conde de Valenciana, after elective cesarean section with informed consent from the donor, and were preserved at −80 °C until used as previously reported [51], washed twice in PBS, and placed on 2 mg/mL of dispase II (Thermo Fisher Scientific, Mexico City, Mexico) for 40 min with the epithelial side towards the Petri dish. At the end they were washed with PBS. The epithelium was mechanically removed by softly rubbing the membranes with a sterile cotton swab. The PC membrane was removed from the trans-well wells and substituted by the amniotic membrane attached with a rubber band. Three conditions were tested—(1) hOMSCs with DMEM/F12; (2) hOMSCs with SHEM; (3) LEC and hOMSCs were plated simultaneously on coverslips with conditions 1 and 2. They were kept until confluence, changing the media every other day. Membranes and coverslips were then processed for histological analysis and immunofluorescence.

##### 4.5.2. Immunofluorescence was Performed as Previously Described

hOMSCs were incubated in a humid chamber with a 1:100 dilution of primary antibodies—CK3 (rabbit anti-human) CK12 (goat anti-human), CK19 (mouse anti-human) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Pan-Cadherin (mouse anti-human) E-cadherin (mouse anti-human) (Abcam PLC, Cambridge, UK). Secondary antibodies were diluted 1:800—goat anti-rabbit-FITC and goat anti-mouse-Alexa 594 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Slow Fade Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) was used to mount all coverslips. Negative controls were performed by incubating secondary antibodies in the absence of the primary antibody (Figure S2).

##### 4.5.3. Histology and Immunofluorescence

Membranes were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness, and mounted on glass silanized slides. The sections were deparaffinized in descending concentrations of ethanol and distilled water and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For the immunofluorescence, marker slides were blocked with BSA 1% (albumin 1% in PBS) for 1 hr, washed twice in PBST (Tween 20 0.1% in PBS) and incubated in a humid chamber at a 1:100 dilution of the primary CK3 (rabbit anti-human) CK12 (goat anti-human), CK19 (mouse anti-human) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Pan-Cadherin (mouse anti-human) E-cadherin (mouse anti-human) (Abcam PLC, Cambridge, UK) for 2 h, washed twice in PBST and once in PBS. Secondary antibodies were diluted 1:800; goat anti-mouse-Alexa 594 and goat anti-rabbit-Alexa 546 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Slow Fade Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) was used to mount all coverslips. Negative controls were performed by incubating secondary antibodies in the absence of the primary antibody (Figure S2).

#### 4.6. Microscopic Analysis

Photomicrographs were taken using an Apotome II microscope (Carl Zeiss, Mexico City, Mexico) and processed using the software Zen [52], parameters were set using a

negative control, for each filter combination, and all photomicrographs were analyzed after processing with the set parameters, to standardized autofluorescence and background noise. For immunofluorescence stains, the photomicrographs were analyzed by two independent observers. For H&E stains, the slides were analyzed and described by an oral pathologist.

#### 4.7. Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. For viability and RT-qPCR, T tests were used to analyze differences between two groups, two-way ANOVA was used to analyze overall differences in cell proliferation and Bonferroni's post hoc test to search for differences between pairs of data sets. All analyses were performed using GraphPad Prism 8 [53].

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22115976/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.A. and Y.G.; methodology, S.L., E.P.T.; software, B.B.; validation, E.P.T., F.S.M.; formal analysis, A.N.; investigation, S.L., B.B., F.S.M.; resources, E.P.T., H.A., Y.G.; data curation, E.P.T., A.N., B.B.; writing—original draft preparation, S.L., H.A., A.W.; writing—review and editing, A.W., H.A., Y.G., H.A., Y.G.; supervision, H.A., Y.G., L.H.; project administration, L.H.; funding acquisition, H.A., Y.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM, PAPIIT IN203920, IN203821 and CONACyT-0311. Sonia López Letayf acknowledges the financial support by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, (CVU:656529).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the School of Dentistry of the Universidad Nacional Autónoma de México (CIE/0303/02/2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to “Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud (PMDCMOS-UNAM)”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

MSC	Mesenchymal stem cells
NC	Neural crest
hOMSCs	Human oral mucosa stem cells
LESC	Limbal epithelial stem cells
LESCD	Limbal epithelial stem cells deficiency
RT-qPCR	Reverse transcriptase–real time polymerase chain reaction
LEC	Limbal epithelial cells
SHEM	Supplemental hormonal epithelium medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle medium/Ham 12 medium
ESC	Embryonic stem cells
MEM	Minimum essential medium
FBS	Fetal bovine serum
hEGF	Human epidermal growth factor
DMSO	Dymethylsulfoxide
ITS	Insulin- transferrin-selenium
PBS	Phosphate buffered saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

PFA	Paraformaldehyde
PBST	PBS + 0.1% Tween 20
BSA	Bovine serum albumin
PC	Polycarbonate

## References

- Lakshminpathy, U.; Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* **2005**, *19*, 29–38. [[CrossRef](#)]
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]
- Nombela-Arrieta, C.; Ritz, J.; Silberstein, L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 126–131. [[CrossRef](#)]
- Dupin, E.; Coelho-Aguiar, J.M. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A* **2013**, *83*, 38–47. [[CrossRef](#)]
- Egusa, H.; Sonoyama, W.; Nishimura, M.; Atsuta, I.; Akiyama, K. Stem cells in dentistry—Part I: Stem cell sources. *J. Prosthodont. Res.* **2012**, *56*, 151–165. [[CrossRef](#)]
- Egusa, H.; Sonoyama, W.; Nishimura, M.; Atsuta, I.; Akiyama, K. Stem cells in dentistry—Part II: Clinical applications. *J. Prosthodont. Res.* **2012**, *56*, 229–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abu Eid, R.; Sawair, F.; Landini, G.; Saku, T. Age and the architecture of oral mucosa. *Age* **2012**, *34*, 651–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marynka-Kalmani, K.; Treves, S.; Yafee, M.; Rachima, H.; Gafni, Y.; Cohen, M.A.; Pitaru, S. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells* **2010**, *28*, 984–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ganz, J.; Arie, I.; Ben-Zur, T.; Dadon-Nachum, M.; Pour, S.; Araidy, S.; Pitaru, S.; Offen, D. Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl. Med.* **2014**, *3*, 375–386. [[CrossRef](#)]
- Ganz, J.; Arie, I.; Buch, S.; Zur, T.B.; Barhum, Y.; Pour, S.; Araidy, S.; Pitaru, S.; Offen, D. Dopaminergic-like neurons derived from oral mucosa stem cells by developmental cues improve symptoms in the hemi-parkinsonian rat model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100445. [[CrossRef](#)]
- Gafni, Y.; Rachima, H.; Marynka-Kalmani, K.; Blatt, A.; Vered, Z.; Pitaru, S. A new in vivo/in vitro model for assessing the capacity of human derived oral mucosa stem cells to colonize the infarcted myocardium. *Stem Cell Stud.* **2011**, *1*, e6. [[CrossRef](#)]
- Sonia, L.L. Células Troncales Derivadas de la Lámina Propia de la Mucosa Bucal: Su Potencial en la Regeneración Ósea In Vivo. Master Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, June 2017. Available online: [https://tesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local\\_base=TES01](https://tesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local_base=TES01) (accessed on 28 May 2021).
- Treves-Manusevitz, S.; Hoz, L.; Rachima, H.; Montoya, G.; Tzur, E.; Vardimon, A.; Narayanan, A.S.; Amar, S.; Arzate, H.; Pitaru, S. Stem cells of the lamina propria of human oral mucosa and gingiva develop into mineralized tissues in vivo. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Romero-Mendez, J. Boletín Estadístico-Informativo del Centro Nacional de Trasplantes. *BEI Cenatra* **2019**, *IV*, 55.
- Forrester, J.V.; Dick, A.D.; McMenamin, P.G.; Roberts, F.; Pearlman, E. *The Eye*, 4th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016.
- Cui, D.; Naftel, J.P.; Daley, W.P.; Lynch, J.C.; Haines, D.E.; Yang, G.; Fratkin, J.D. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*, 1st ed.; Lippincot, Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2011; p. 456.
- Navas, A.; Magaña-Guerrero, F.S.; Domínguez-López, A.; Chávez-García, C.; Partido, G.; Graue-Hernández, E.O.; Sánchez-García, F.J.; Garfias, Y. Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells Transl. Med.* **2018**, *7*, 906–917. [[CrossRef](#)]
- Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* **2003**, *22*, S28–S34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tsai, R.J.; Li, L.M.; Chen, J.K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 86–93. [[CrossRef](#)]
- Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Yamamoto, K.; Adachi, E.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Maeda, N.; Watanabe, H.; et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1187–1196. [[CrossRef](#)]
- Koizumi, N.; Inatomi, T.; Suzuki, T.; Sotozono, C.; Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 1569–1574. [[CrossRef](#)]
- Zhang, L.; Coulson-Thomas, V.J.; Ferreira, T.G.; Kao, W.W. Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC Ophthalmol.* **2015**, *15* (Suppl. 1), 155. [[CrossRef](#)]
- Harkin, D.G.; Foy, L.; Bray, L.J.; Sutherland, A.J.; Li, F.J.; Cronin, B.G. Concise reviews: Can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells* **2015**, *33*, 785–791. [[CrossRef](#)]
- Serna-Ojeda, J.C.; García-Mejía, M.; Graue-Hernández, E.O.; Navas, A.; Garfias, Y. Short-Term Results Analysis in the Allogenic Transplantation of Limbal Stem Cells Expanded on Amniotic Membrane in Patients with Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2020**, *36*, 238–246. [[CrossRef](#)]
- Jirsova, K.; Jones, G.L. Amniotic membrane in ophthalmology: Properties, preparation, storage and indications for grafting—A review. *Cell Tissue Bank* **2017**, *18*, 193–204. [[CrossRef](#)]

26. Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C.; Widera, D. Adult craniofacial stem cells: Sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev. Rep.* **2012**, *8*, 658–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Weidgang, C.E.; Seufferlein, T.; Kleger, A.; Mueller, M. Pluripotency Factors on Their Lineage Move. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 6838253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Liu, L.; Michowski, W.; Kolodziejczyk, A.; Sicinski, P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1060–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Li, M.; Izpisua Belmonte, J.C. Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 382–392. [[CrossRef](#)]
30. Thomson, M.; Liu, S.J.; Zou, L.N.; Smith, Z.; Meissner, A.; Ramanathan, S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **2011**, *145*, 875–889. [[CrossRef](#)]
31. Heavner, W.; Pevny, L. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008391. [[CrossRef](#)]
32. Utheim, T.P. Concise review: Transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency—current status and future perspectives. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1685–1695. [[CrossRef](#)]
33. Utheim, T.P.; Utheim, Ø.; Khan, Q.E.; Sehic, A. Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for the Purpose of Treating Limbal Stem Cell Deficiency. *J. Funct. Biomater.* **2016**, *7*, 5. [[CrossRef](#)]
34. Nowell, C.S.; Odermatt, P.D.; Azzolin, L.; Hohnel, S.; Wagner, E.F.; Fantner, G.E.; Lutolf, M.P.; Barrandon, Y.; Piccolo, S.; Radtke, F. Chronic inflammation imposes aberrant cell fate in regenerating epithelia through mechanotransduction. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 168–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed.; Garland Science: New York, NY, USA, 2015; p. 1465.
36. Brightbill, F. *Corneal Surgery: Theory, Technique and Tissue*, 4th ed.; Mosby: Maryland Heights, MO, USA, 2009; p. 877.
37. Masterton, S.; Ahearne, M. Mechanobiology of the corneal epithelium. *Exp. Eye Res.* **2018**, *177*, 122–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dziasko, M.A.; Daniels, J.T. Anatomical Features and Cell–Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *Ocul. Surf.* **2016**, *14*, 322–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ma, J.; Wang, Y.; Wei, P.; Jhanji, V. Biomechanics and structure of the cornea: Implications and association with corneal disorders. *Surv. Ophthalmol.* **2018**, *63*, 851–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Di Iorio, E.; Barbaro, V.; Ruzza, A.; Ponzin, D.; Pellegrini, G.; De Luca, M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal epithelial cells. *Stem Cells* **2005**, *23*, 63–73.
41. Ksander, B.R.; Kolovou, P.E.; Wilson, B.J.; Saab, K.R.; Guo, Q.; Ma, J.; McGuire, S.P.; Gregory, M.S.; Vincent, W.J.; Perez, V.L.; et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature* **2014**, *511*, 353–357. [[CrossRef](#)]
42. Wells, W.A. Is transdifferentiation in trouble? *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 15–18. [[CrossRef](#)]
43. Wagner, B.K. Grand challenge commentary: Chemical transdifferentiation and regenerative medicine. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 877–879. [[CrossRef](#)]
44. Hybiak, J.; Jankowska, K.; Machaj, F.; Rosik, J.; Broniarek, I.; Żyluk, A.; Hilderman, G.C.; Małecki, A.; Łos, M.J.; Urasińska, E. Reprogramming and transdifferentiation—Two key processes for regenerative medicine. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *882*, 173202. [[CrossRef](#)]
45. Kim, H.Y.; Jackson, T.R.; Davidson, L.A. On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *67*, 113–122. [[CrossRef](#)]
46. Gouveia, R.M.; Vajda, F.; Wibowo, J.A.; Figueiredo, F.; Connon, C.J. YAP, ΔNp63, and β-Catenin Signaling Pathways are Involved in the Modulation of Corneal Epithelial Stem Cell Phenotype Induced by Substrate Stiffness. *Cells* **2019**, *8*, 347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gouveia, R.M.; Lepert, G.; Gupta, S.; Mohan, R.R.; Paterson, C.; Connon, C.J. Assessment of corneal substrate biomechanics and its effect on epithelial stem cell maintenance and differentiation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lee, H.J.; Nam, S.M.; Choi, S.K.; Seo, K.Y.; Kim, H.O.; Chung, S.H. Comparative study of substrate free and amniotic membrane scaffolds for cultivation of limbal epithelial sheet. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14628. [[CrossRef](#)]
49. Monteiro, B.G.; Loureiro, R.R.; Cristovam, P.C.; Covre, J.L.; Gomes, J.P.; Kerkis, I. Amniotic membrane as a biological scaffold for dental pulp stem cell transplantation in ocular surface reconstruction. *Arq. Bras. Oftalmol.* **2019**, *82*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Holan, V.; Trosan, P.; Cejka, C.; Javorkova, E.; Zajicova, A.; Hermankova, B.; Chudickova, M.; Cejkova, J. A Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Limbal Epithelial Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 1052–1063. [[CrossRef](#)]
51. Chávez-García, C.; Jiménez-Corona, A.; Graue-Hernández, E.O.; Zaga-Clavellina, V.; García-Mejía, M.; Jiménez-Martínez, M.C.; Garfias, Y. Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: An eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell Tissue Bank* **2016**, *17*, 261–268. [[CrossRef](#)]
52. *Zen 2, 2.0.0.0*; Carl Zeiss Microscopy GmbH: Jena, Germany, 2011.
53. Motulsky, D.H. *Graphpad*, 8th ed.; GraphPad Software: San Diego, CA, USA, 2021.

# Referencias, Citas y Bibliografía

1. Lakshmi U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 2005;19(1):29-38.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
3. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(2):126-31.
4. Dupin E, Coelho-Aguiar JM. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A.* 2013;83(1):38-47.
5. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56(3):151-65.
6. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res.* 2012;56(4):229-48.
7. Abu Eid R, Sawair F, Landini G, Saku T. Age and the architecture of oral mucosa. *Age (Dordr).* 2012;34(3):651-8.
8. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, et al. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells.* 2010;28(5):984-95.
9. Gafni YR, H. Marynka-Kalmani K, Blatt, A, Vered, Z, Pitaru, S. A new in vivo/in vitro model for assessing the capacity of human derived oral mucosa stem cells to colonize the infarcted myocardium. *Stem Cell Studies.* 2011;1(1):6.
10. Ganz J, Arie I, Buch S, Zur TB, Barhum Y, Pour S, et al. Dopaminergic-like neurons derived from oral mucosa stem cells by developmental cues improve symptoms in the hemi-parkinsonian rat model. *PLoS One.* 2014;9(6):e100445.
11. Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S, et al. Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(3):375-86.
12. Sonia L-L. Células Troncales Derivadas de la Lámina Propia de la Mucosa Bucal: Su Potencial en la Regeneración Ósea in vivo. UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
13. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35(2):213-21.
14. Davies LC, Lönnies H, Locke M, Sundberg B, Rosendahl K, Götherström C, et al. Oral mucosal progenitor cells are potently immunosuppressive in a dose-independent manner. *Stem Cells Dev.* 2012;21(9):1478-87.
15. Josefina RM. Boletín Estadístico-Informativo del Centro Nacional de Trasplantes BEI-CENATRA. In: Salud-CENATRA Sd, editor. CDMX, México: Gobierno de México; 2019. p. 55.
16. Cui D, Naftel JP, Daley WP, Lynch JC, Haines DE, Yang G, et al. Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. 1<sup>st</sup> ed. Cui D, editor. Baltimore, MD, USA: Lippincott, Williams, Wilkins; 2011. 456 p.
17. Navas A, Magaña-Guerrero FS, Domínguez-López A, Chávez-García C, Partido G, Graue-Hernández EO, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(12):906-17.
18. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea.* 2003;22(7 Suppl):S28-34.
19. 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.
20. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med.* 2004;351(12):1187-96.
21. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 2001;108(9):1569-74.
22. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Ferreira TG, Kao WW. Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC Ophthalmol.* 2015;15 Suppl 1:155.

23. Harkin DG, Foyl L, Bray LJ, Sutherland AJ, Li FJ, Cronin BG. Concise reviews: can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells*. 2015;33(3):785-91.
24. Dadheech N, Srivastava A, Belani M, Gupta S, Pal R, Bhonde RR, et al. Basal expression of pluripotency-associated genes can contribute to stemness property and differentiation potential. *Stem Cells Dev*. 2013;22(12):1802-17.
25. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):193-204.
26. Serna-Ojeda JC, García-Mejía M, Graue-Hernández EO, Navas A, Garfias Y. Short-Term Results Analysis in the Allogenic Transplantation of Limbal Stem Cells Expanded on Amniotic Membrane in Patients with Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2020.
27. J M, R P. Chapter 17 - The Basic Principles of Stem Cells in Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M, editors. Boston: Academic Press; 2015.
28. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.
29. Lanza RP, Atala A. Essentials of stem cell biology. Second edition. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2014. xxviii, 680 pages p.
30. Ilic D, Polak JM. Stem Cells in regenerative medicine: introduction. *British Medical Bulletin*. 2011;98:117-26.
31. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31.
32. Aquino JB. Uncovering the In Vivo Source of Adult Neural Crest Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2017;26(5):303-13.
33. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Widera D. Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev Rep*. 2012;8(3):658-71.
34. Liu J, Mao JJ, Chen L. Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(1):25-31.
35. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res*. 2003;82(8):621-6.
36. Glim JE, Everts V, Niessen FB, Ulrich MM, Beelen RH. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin. *Arch Oral Biol*. 2014;59(10):1048-55.
37. Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, et al. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev*. 2010;19(6):819-30.
38. Treves-Manusevitz S, Hoz L, Rachima H, Montoya G, Tzur E, Vardimon A, et al. Stem cells of the lamina propria of human oral mucosa and gingiva develop into mineralized tissues in vivo. *J Clin Periodontol*. 2013;40(1):73-81.
39. Forrester JV, Dick AD, McMEnamin PG, Roberts F, Pearlman E. *The Eye*. 4th ed. Forrester JVD, Andrew D, McMEnamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors: Elsevier; 2016.
40. Richardson A, Wakefield D, Di Girolamo N. Fate Mapping Mammalian Corneal Epithelia. *Ocul Surf*. 2016;14(2):82-99.
41. Di Girolamo N. Moving epithelia: Tracking the fate of mammalian limbal epithelial stem cells. *Prog Retin Eye Res*. 2015;48:203-25.
42. Chávez-García C, Jiménez-Corona A, Graue-Hernández EO, Zaga-Clavellina V, García-Mejía M, Jiménez-Martínez MC, et al. Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(2):261-8.
43. Dhamodaran K, Subramani M, Jeyabalan N, Ponnalagu M, Chevour P, Shetty R, et al. Characterization of ex vivo cultured limbal, conjunctival, and oral mucosal cells: A comparative study with implications in transplantation medicine. *Mol Vis*. 2015;21:828-45.
44. Utheim TP, Utheim Ø, Khan QE, Sehic A. Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for the Purpose of Treating Limbal Stem Cell Deficiency. *J Funct Biomater*. 2016;7(1).
45. Utheim TP. Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives. *Stem Cells*. 2015;33(6):1685-95.
46. Oliva J, Bardag-Gorce F, Niihara Y. Clinical Trials of Limbal Stem Cell Deficiency Treated with Oral Mucosal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2).



47. Tan A, Tan DT, Tan XW, Mehta JS. Osteo-odonto keratoprosthesis: systematic review of surgical outcomes and complication rates. *Ocul Surf.* 2012;10(1):15-25.
48. Fénelon M, Catros S, Meyer C, Fricain JC, Obert L, Auber F, et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes (Basel).* 2021;11(6).
49. Lee HJ, Nam SM, Choi SK, Seo KY, Kim HO, Chung SH. Comparative study of substrate free and amniotic membrane scaffolds for cultivation of limbal epithelial sheet. *Sci Rep.* 2018;8(1):14628.
50. Weidgang CE, Seufferlein T, Kleger A, Mueller M. Pluripotency Factors on Their Lineage Move. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6838253.
51. Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, et al. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4073-83.
52. Gomes JA, Gerales Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(3):1408-14.
53. Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis.* 2010;16:1304-16.
54. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 6th ed. New York, USA: Garland Science; 2015. 1465 p.
55. Brightbill F. *Corneal Surgery: Theory, Technique and Tissue.* 4th ed: Mosby; 2009 877 p.
56. Wells WA. Is transdifferentiation in trouble? *J Cell Biol.* 2002;157(1):15-8.
57. Hybiak J, Jankowska K, Machaj F, Rosik J, Broniarek I, Żyluk A, et al. Reprogramming and transdifferentiation - two key processes for regenerative medicine. *Eur J Pharmacol.* 2020;882:173202.
58. Kim HY, Jackson TR, Davidson LA. On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;67:113-22.
59. Wagner BK. Grand challenge commentary: Chemical transdifferentiation and regenerative medicine. *Nat Chem Biol.* 2010;6(12):877-9.
60. Nowell CS, Odermatt PD, Azzolin L, Hohnel S, Wagner EF, Fantner GE, et al. Chronic inflammation imposes aberrant cell fate in regenerating epithelia through mechanotransduction. *Nat Cell Biol.* 2016;18(2):168-80.
61. Gouveia RM, Lepert G, Gupta S, Mohan RR, Paterson C, Connon CJ. Assessment of corneal substrate biomechanics and its effect on epithelial stem cell maintenance and differentiation. *Nat Commun.* 2019;10(1):1496.
62. Gouveia RM, Vajda F, Wibowo JA, Figueiredo F, Connon CJ. YAP,  $\Delta$ Np63, and  $\beta$ -Catenin Signaling Pathways Are Involved in the Modulation of Corneal Epithelial Stem Cell Phenotype Induced by Substrate Stiffness. *Cells.* 2019;8(4).