



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXPANSIÓN *IN VITRO* DE  
CÉLULAS TRONCALES EPITELIALES LIMBALES  
MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS COMO MATRIZ  
EXTRACELULAR**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**TÉLLEZ GONZÁLEZ MARIO ANTONIO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN**

**MÉXICO, D.F., 2015**



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.

**Datos del Alumno**

Téllez  
González  
Mario Antonio  
55 37 05 62 20  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Biología  
308320471

**Datos del Tutor**

Dr.  
Paul  
Mondragón  
Terán

**Datos del Sinodal 1**

Dr.  
Jorge Eduardo  
Campos  
Contreras

**Datos del Sinodal 2**

Mtra.  
Pilar Hazel  
Carranza  
Castro

**Datos del Sinodal 3**

Dr.  
Alonso Antonio  
Vilches  
Flores

**Datos del Sinodal 4**

Biol.  
Francisco Javier  
Martínez  
López

**Datos del Trabajo Escrito**

Optimización de la expansión *in vitro* de las células troncales epiteliales limbales mediante el uso de proteínas como matriz extracelular.

102p.  
2015

*Los jóvenes no saben suficiente como para ser prudentes y por ello intentan lo imposible... y lo consiguen generación tras generación.*

*Pearl S. Buck*

## **Dedicatoria**

Quisiera dedicar esta Tesis a mis padres Mario Téllez Chávez y María de Jesús González Arevalo, durante mi formación académica ustedes han sido mi mano derecha y quienes me han guiado durante este arduo camino. Es cierto, no ha sido fácil, sin embargo gracias a su ayuda esto no fue tan complicado.

Mario Antonio Téllez González

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala como institución por haber culminado mi formación académica, las llevaré siempre en mi mente.

Al Dr. Paul Mondragón Terán por aceptarme en su laboratorio, por aportarme sus conocimientos, ser un excelente mentor y por forjarme como profesionista y como biólogo.

A mi padre por siempre tener sabias palabras y consejos, aunque en el momento no supe la enseñanza pero siempre fueron lecciones de vida, te agradezco por igual todas las charlas que tuvimos en camino hacia nuestro destino y por nunca dejarme solo, siempre has estado ahí aunque a veces no te viera.

A mi madre, por todo tu esfuerzo y dedicación, nunca olvidaré la infinidad de madrugadas en las que te levantaste con tal de que tu hijo no se fuera sin nada en el estómago, de manera especial me gustaría agradecerte por siempre apoyarme y alentarme a que cumpla todos mis sueños.

A mis hermanas Dafne y Odalys por siempre estar conmigo en todos los acontecimientos de mi vida, por darme consejos y por regañarme cuando me hacía falta.

A mis primos Sebastián, Alexis y Emanuel, por ser más que primos, ser hermanos. A pesar de que estemos separados sabemos que nadie nos va a separar (los 3 potrillos por siempre).

Al Biol. Javier Martínez López por introducirme al campo de la biología del desarrollo y por consecuente al mundo de las células troncales.

A cada uno de mis amigos; Biol. Cerón Fortis Julio, Biol. Hidalgo Gabriel Alexa, Biol. Rodríguez Alejandro, Biol. González Calderón Brenda y al Biol. Alemán Cortés Alberto, por ser más que amigos, ser una pequeña familia con la cual compartí momentos únicos dentro de la carrera, ya no volveré a ver el campo, el universo, el arte, la danza, la música ni la vida de la misma manera. Son mis amigos y compañeros de vida.

A Montserrat Velasco Alarcón por haber llegado a mi vida en el momento justo y adecuado, ya que una parte de mi formación también te lo debo a ti, gracias por apoyarme en todos los aspectos, alentarme a seguir y por brindarme momentos de gran felicidad..

A todos mis profesores de quienes fui aprendiendo, en especial aquellos que me quitaron el miedo de preguntar, me llenaron de sus conocimientos, me enseñaron el arte del laboratorio, y me indujeron poco a poco el método científico desde muy temprana edad.

Y por último quisiera agradecer a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Medicina Regenerativa e ingeniería de Tejidos del CMN “20 de Noviembre ISSSTE”, el laboratorio no será el mismo sin ustedes (Miguel, Alan, Arturo, Mario, Ivette, Miguel y Alexis).

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>3. Marco Teórico</b> .....	4
<b>3.1 Células Troncales</b> .....	4
<b>3.2 División de las Células Troncales</b> .....	5
<b>3.3 Clasificación de las Células Troncales</b> .....	5
<b>3.4 Estructura Anatómica de la córnea</b> .....	8
<b>3.5 Células Troncales Epiteliales Limbales (CTEL)</b> .....	11
<b>3.6 Células Amplificadoras en Transito</b> .....	14
<b>3.7 Enfermedades la córnea y aplicaciones a la medicina generativa</b> .....	15
<b>4. Antecedentes</b> .....	16
<b>5. Justificación</b> .....	19
<b>6. Hipótesis</b> .....	19
<b>7. Objetivos</b> .....	20
<b>7.1 Objetivo principal</b> .....	20
<b>7.2 Objetivos particulares</b> .....	20
<b>8. Materiales y Métodos</b> .....	21
<b>8.1 Extracción de rodetes esclero-corneales</b> .....	21
<b>8.2 Descontaminación</b> .....	22
<b>8.3 Aislamiento y cultivo de las CTCL</b> .....	24
<b>8.4 Inmunocitoquímica</b> .....	25
<b>8.5 Evaluación de la expansión celular</b> .....	26
<b>8.6 Evaluación de Pureza</b> .....	26
<b>8.7 Análisis estadístico</b> .....	26
<b>8.8 Registro institucional del proyecto</b> .....	27
<b>8.9 Aspectos éticos</b> .....	27
<b>8.10 Aspectos de bioseguridad</b> .....	28
<b>9. Resultados</b> .....	29
<b>9.1 Extracción los rodetes esclerocorneales de modelos animales</b> .....	29
<b>9.2 Descontaminación</b> .....	30

<b>9.3 Inmunofenotipo.....</b>	<b>30</b>
<b>9.4 Afinidad de las células epiteliales (Ck3+) a diferentes proteínas como matriz extracelular.....</b>	<b>31</b>
<b>9.4.1 Afinidad de Célula Epiteliales Corneales (CK3+) a 168 h de cultivo.....</b>	<b>32</b>
<b>9.4.2 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 216 h de cultivo.....</b>	<b>37</b>
<b>9.4.3 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 288 h de cultivo.....</b>	<b>41</b>
<b>9.4.4 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 360 h de cultivo.....</b>	<b>46</b>
<b>9.5 Afinidad de las Células Troncales Epiteliales Limbales (p63-<math>\alpha</math>+) a diferentes proteínas como matriz extracelular.....</b>	<b>51</b>
<b>9.5.1 Afinidad de CTCL (p63-<math>\alpha</math>+) a 168 h de cultivo.....</b>	<b>52</b>
<b>9.5.2 Afinidad de CTCL (p63-<math>\alpha</math>+) a 216 h de cultivo.....</b>	<b>56</b>
<b>9.5.3 Afinidad de CTCL (p63-<math>\alpha</math>+) a 288 h de cultivo.....</b>	<b>61</b>
<b>9.5.4 Afinidad de CTCL (p63-<math>\alpha</math>+) a 360 h de cultivo.....</b>	<b>65</b>
<b>9.6 Evaluación de la expansión celular.....</b>	<b>70</b>
<b>10. Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>11. Conclusiones.....</b>	<b>77</b>
<b>12. Perspectivas.....</b>	<b>78</b>
<b>13. Literatura Citada.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>88</b>

## Glosario

**Andamio:** Estructuras o soportes que imitan a la matriz extracelular del tejido. Estos soportes se construyen con materiales distintos en función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar.

**Blastocisto:** Un blastocisto es un embrión de 5 o 6 días de desarrollo después de la fecundación y antes de la implantación al endometrio. Está compuesta por una prominente cavidad y el blastocele.

**Célula troncal:** Células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y con un potencial de diferenciación hacia diferentes tipos celulares.

**Corión:** El corion es una envoltura externa que recubre el embrión humano y que colabora en la formación de la placenta.

**Embriogénesis:** Proceso complejo que ocurre durante las primeras ocho semanas después de la fertilización de los gametos para dar lugar al embrión.

**Fenotipo:** Es la apariencia o manifestación de una característica de cualquier tipo: física, fisiológica, bioquímica o conductual. Manifestación externa observable de un genotipo.

**Genotipo:** Conjunto de alelos que posee un organismo individual. Composición alélica específica de una célula, bien referida al total de su genoma o, más comúnmente, a un gen determinado o a un conjunto de genes.

**Holoclona:** Células troncales cuya progenie forma colonias que tienen un potencial de crecimiento más alto que una meroclona porque no contiene células diferenciadas.

**Isotipo:** Cada uno de los cinco tipos de anticuerpos, determinado por una de las cinco formas distintas de cadena pesada que los constituyen. Los isotipos de anticuerpos son IgM, IgE, IgG, IgD, IgA y cada uno de ellos tiene un grupo de funciones efectoras.

**Matriz Extracelular:** La matriz extracelular constituye un conjunto de macromoléculas secretadas por células en su ambiente inmediato donde realizan sus funciones vitales: multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y fisiopatológicos.

**Medio químicamente definido:** EL medio es aquel que provee una fuente de energía para que las células puedan crecer, un medio químicamente definido es aquel donde se conoce exactamente la composición química que integran al medio de cultivo.

**Membrana Amniótica:** Membrana avascular con grosor de 0,02 a 0,5 mm compuesta por una capa única de células cuboideas y su membrana basal que descansa sobre una capa de tejido conectivo próxima al corion.

**Meroclona:** Células troncales formadoras de colonias que tienen un potencial de crecimiento más bajo que una holoclona, por ser una mezcla de células troncales y células diferenciadas.

**Mórula:** Es una masa de células que se da como consecuencia de la segmentación de la célula inicial o cigoto, la cual sufre numerosas divisiones en forma de blastómeros que acaban por desencadenar esta forma característica, normalmente atribuida a aquella estructura que se compone de 12 a 16 células

**Xenobiótico:** Compuesto ajeno al cuerpo humano.

# 1. Resumen

Las células troncales epiteliales limbales (CTEL), son células unipotentes que se localizan en el limbo esclero-corneal; en las últimas décadas se ha demostrado que estas células juegan un papel importante en el mantenimiento y la regeneración de la córnea. Su ausencia en este tejido llega a generar complicaciones como la opacificación de la córnea.

El cultivo *in vitro* de las CTEL, se considera una fuente celular potencial aplicación en medicina regenerativa. Se investigó el efecto del uso de las proteínas Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I y Colágeno tipo IV (se seleccionaron por su presencia normal en la córnea humana) como matriz extracelular durante la expansión de CTEL provenientes de rodetes esclero-corneales de conejo. Después de 288h de cultivo, se observó una mayor afinidad de CTEL a la ME de colágeno tipo I ( $p=0.00036$ ,  $\alpha=0.05$ ) con una pureza de cultivo del 90%, y una mayor afinidad de células corneales a una ME de colágeno tipo IV ( $p=0.0093$ ,  $\alpha=0.05$ ). Con estos resultados se puede concluir que, a partir de anillos esclero-corneales, es posible realizar la expansión selectiva de CTEL en medios químicamente definidos.

Palabras clave:

Células troncales epiteliales limbales, Matriz extracelular, Medicina Regenerativa.

## 2. Introducción

Actualmente el estudio de las células troncales (CT) ha sido enfocado tanto a la generación de conocimientos básicos sobre sus aspectos biológicos, así como en la manipulación *in vitro* para su posible aplicación clínica; por lo que la investigación sobre CT derivadas de tejidos ha sido el principal objetivo de muchos investigadores (Burgess R., 2013). Diversas CT derivadas de tejido de origen adulto, se creen que están resguardadas en un área específica o “un nicho” dentro de un microambiente, rodeadas de células y substratos que controlan su auto-replicación y su potencial de diferenciación (Daniels *et al.*, 2001).

Se ha reportado que una población de CT, conocida como Células Troncales Epiteliales Limbales (CTEL) residen en el limbo esclero corneal; estas células son las responsables de la regeneración del epitelio corneal, en respuesta al desgaste normal y/o posterior a alguna lesión (Schlötzer & Kruse, 2005). La deficiencia de CTEL es caracterizada por la vascularización corneal, como consecuencia de una deficiente salud ocular derivada por daño físico, químico o por diversas enfermedades (Rama *et al.*, 2010).

Existen reportes de terapia celular para revertir la deficiencia de CTEL; basados en la expansión *in vitro*. Algunos reportes utilizan como estrategia, el co-cultivo de CTEL con células de fibroblasto de ratón embrionario ‘3T3’, otros emplean membrana amniótica como soporte directo para el cultivo (O’Callaghan *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente se ha investigado nuevas alternativas a partir de polímeros sintéticos y/o derivados de alguna proteína como andamiaje para las CTEL con la finalidad de reducir las posibles fuentes de contaminación xenobiótica o viral (Chae *et al.*, 2015).

Uno de los mayores retos que enfrenta el cultivo CTEL es su óptima derivación y expansión en medios de cultivo químicamente definidos; con la finalidad de generar una cantidad suficiente de células con el fenotipo y genotipo correcto; así

## 2. Introducción

como erradicar a las células o componentes biológicos que comprometen la seguridad y eficacia del tratamiento (Mondragón-Teran *et al.*, 2011).

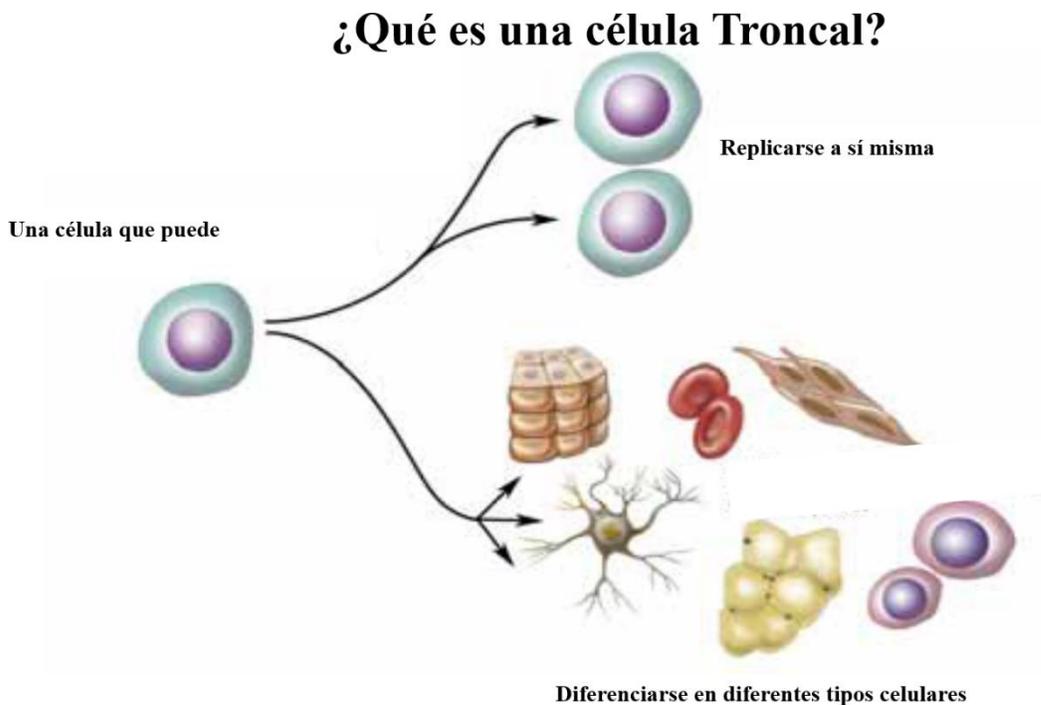
La Matriz extracelular (ME) juega un papel importante en el microambiente de las CT, ya que les permite mantener su estado troncal (Mei *et al.*, 2012). A pesar de que hoy en día se conocen los principales componentes principales de la ME de las células corneales; aún no se ha definido una proteína que promueva selectivamente la expansión *in vitro* de las CTCL (Li *et al.*, 2005).

## 3. Marco Teórico

### 3.1 Células Troncales

Las CT, al no poseer características morfológicas que faciliten su identificación y al estar asociadas con funciones de regeneración en el tejido ubicado, son difíciles de definir conceptualmente. Sin embargo, en virtud de sus atributos funcionales se han definido como células indiferenciadas capaces de auto-replicarse, proliferar, y que poseen un alto potencial de diferenciación a distintos tipos de células especializadas (Figura 1), no sólo morfológicamente sino también de forma funcional (Can, 2008).

Su aislamiento y caracterización significan un reto metodológico, ya que al fin de determinar si una célula es troncal o no, tiene que ser probada, mediante la manipulación *in vitro* pudiendo resultar en la alteración de alguna de sus propiedades (Potten & Loeffen, 1990).



**Figura 1.** Propiedades fisiológicas de las Células Troncales (CT). Se esquematiza las propiedades de autoreplicación y potencial de diferenciación de las CT. Modificada de: National Academic of Science [http:// www.nationalacademies.org/stemcells](http://www.nationalacademies.org/stemcells).

## 3.2 División de las Células Troncales

Una CT puede tener una división simétrica, dando como resultado 2 células hijas similares a la progenitora, pero una CT también realiza una división asimétrica, en la que una de las 2 células resultantes conserva casi la totalidad de características biológicas de la célula original y la segunda pierde esa capacidad de troncalidad, iniciando un proceso de diferenciación o especialización, produciendo proteínas requeridas para su propia función dentro del tejido u órgano al cual formará parte (Mummery *et al.*, 2011). Si se realiza un balance entre las divisiones simétricas y asimétricas, las CT son las únicas células con la capacidad de mantener su progenie en la misma cantidad.

Dependiendo de la ubicación al momento de su extracción las CT se dividen conceptualmente en dos tipos: células troncales embrionarias (CTE) y células troncales adultas o somáticas. Las CTE, se encuentran en la masa celular interna del blastocisto, y son capaces de formar al embrión; por otro lado las CT somáticas se encuentran en tejidos postnatales (Obokata H. & Vacanti C.A., 2014).

## 3.3 Clasificación de las Células Troncales

Las CT se clasifican dependiendo a su potencial de diferenciación, de acuerdo con el orden jerárquico del desarrollo embrionario (Holland *et al.*, 2001). Se dice que una CT muestra mayor potencialidad cuando se pueden obtener gran cantidad de líneas celulares *In vitro* o *In vivo*, y que posee menor potencialidad cuando muestran la obtención de un reducido número líneas celulares (Amat *et al.*, 2012).

De acuerdo a este concepto, las CT son clasificadas por su potencialidad, las primeras células troncales las llamamos **totipotenciales**, debido a que son capaces de producir a un embrión incluyendo sus estructuras extraembrionarias (la placenta, saco vitelino y el cordón umbilical), éstas las encontramos

### 3. Marco Teórico

únicamente en la mórula (Lodish *et al.*, 2005).

Conforme avanza el desarrollo embrionario las células van perdiendo su potencialidad; al llegar al estadio de blastocisto, cada una de las células que forman parte de la masa celular interna, son incapaces de constituir estructuras extraembrionarias; tienen la capacidad de desarrollar cualquier célula de las 3 líneas germinales, a éste tipo celular se le denomina células troncales **pluripotentes** (Surani, 2007; NIH HHS, 2011).

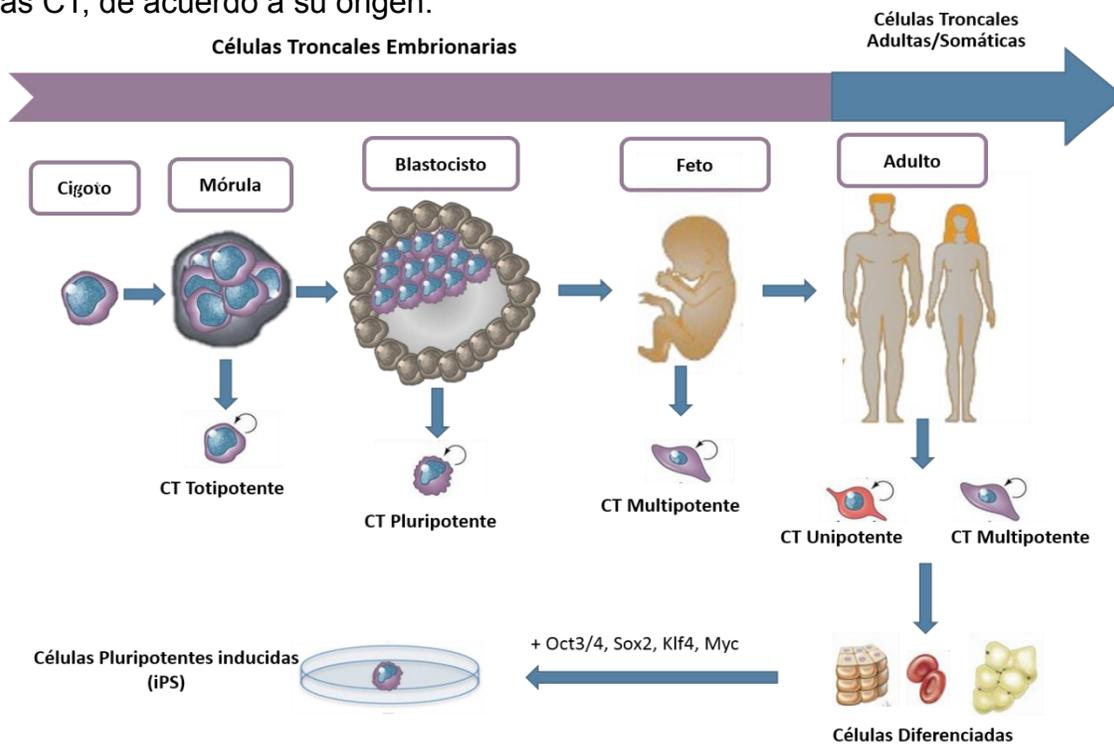
Continuando con la embriogénesis, en la gastrulación hay una migración y reorganización celular altamente coordinada, que mediante invaginaciones, involuciones y delaminaciones, producen la delimitación y diferenciación de las 3 capas germinales: Ectodermo, Mesodermo y Endodermo (Gilbert, 2005). A partir de este punto podemos encontrar diferentes CT localizadas en tejidos específicos en el embrión. Estas células son nombradas CT **multipotentes**, ya que son capaces de generar diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido, limitando su potencial de diferenciación. Un ejemplo de estas CT multipotentes es la población de células troncales hematopoyéticas (CTH), siendo las encargadas de dirigir la formación y regeneración de la sangre durante el desarrollo embrionario y la etapa postnatal (Silverthorn *et al.*, 2007). Las CTH son capaces de generar una diferenciación a diversos tipos de células sanguíneas p. ej. eritrocitos, leucocitos, monocitos, plaquetas, células NK, células presentadoras, entre otras (Burgess, 2013).

Así dependiendo a nivel de potencialidad, llegamos hasta las CT **unipotentes**, éstas son capaces de diferenciarse hacia un solo tipo de células, donde su función es mantener y regenerar al tejido en donde están ubicados. Un ejemplo claro de las CT unipotentes, no somáticas son las CT germinales, las cuales migran hacia las gónadas en el desarrollo embrionario (crestas genitales) y eventualmente dan lugar a los gametos (Potten, de Rooji & Van Dissel, 1997).

El estudio de las CTE humanas se ha visto interrumpido en muchos países por la enorme controversia ética que representan, al ser generadas a partir de los

### 3. Marco Teórico

primeros estadios del desarrollo embrionario. En respuesta a este conflicto, diversos grupos de investigación se dieron a la tarea de buscar otra forma de obtener células troncales pluripotentes de origen humano, pero no fue sino hasta el 2010 que un investigador japonés llamado Shinya Yamanaka obtuvo el premio Nobel de medicina por su aportación al mundo científico, logrando en el año 2006, reprogramar a las células somáticas de tal forma que se obtenía un comportamiento de una CT pluripotente, a estas nuevas células las nombraron células iPS (del inglés, Induced Pluripotent Stem Cells). En su protocolo describe como se reprogramaron con éxito fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs del inglés, Mouse Embryonic Fibroblasts) y fibroblastos adultos, tras una infección con retrovirus que codificaban para diversos factores de transcripción. Al principio fueron 21 factores los que probaron, se eligieron las mejores colonias, y gradualmente depuraron factores a los que no se le atribuían la expresión fenotípica y genotípica de una colonia de CT pluripotente, hasta llegar a 4 factores imprescindibles para obtener una iPS siendo estos: OCT3/4, Sox 2, c-myc y Klf4 (Yamnaka, 2009). En la Figura 2, se representa gráficamente la potencialidad de las CT, de acuerdo a su origen.



**Figura 2** Tipos de CT y su localización en el desarrollo embrionario. Se muestra la Potencialidad de las diferentes CT así como su localización. Imagen modificada de Imagen modificada de Donovan & Gearhart. 2001.

En la actualidad, el estudio de las CT ha sido enfocado tanto a la generación de conocimientos básicos sobre su comportamiento biológico, como a su manipulación *in vitro* para su posible aplicación clínica. Muchas CT del tejido adulto, se considera que están resguardadas en un área específica dentro de un tejido en un estado de quiescencia, siendo que no se dividen hasta ser activadas por enfermedad, lesión o simplemente para sustituir a las células perdidas de forma natural (Secker *et al.*, 2009).

Estas CT son de enorme interés biológico, dado que no representan ningún reto ético y muchas veces se pueden obtener a partir de tejidos que son considerados residuos o desechos biológicos como es el caso de la placenta, la sangre de cordón umbilical, y los anillos esclero-corneales remanentes después de realizar trasplante de córnea (Kelly, 2007).

En las últimas décadas se ha demostrado que una población de CT adultas, conocida como Células Troncales Epiteliales Limbales (CTEL) son las responsables de la generación del epitelio corneal, en respuesta al desgaste normal y después de alguna lesión.

#### 3.4 Estructura Anatómica de la córnea

De acuerdo a la etapa de desarrollo embrionario, la córnea proviene de la cámara anterior, desarrollándose a partir de un espacio hendido que se forma en el mesénquima del cristalino en formación (Khurana, 2014).

El cristalino induce al ectodermo superficial a transformarse en el epitelio de la córnea y conjuntiva. Por lo tanto la córnea se forma a partir de dos estructuras: ectodermo superficial y mesodermo. El ectodermo superficial forma la cara anterior de la córnea, cubierta por un epitelio escamoso estratificado no queratinizante. El endotelio corneal constituido por tejido conectivo fibroso denso y epitelio escamoso simple se deriva del mesénquima que se encuentra por

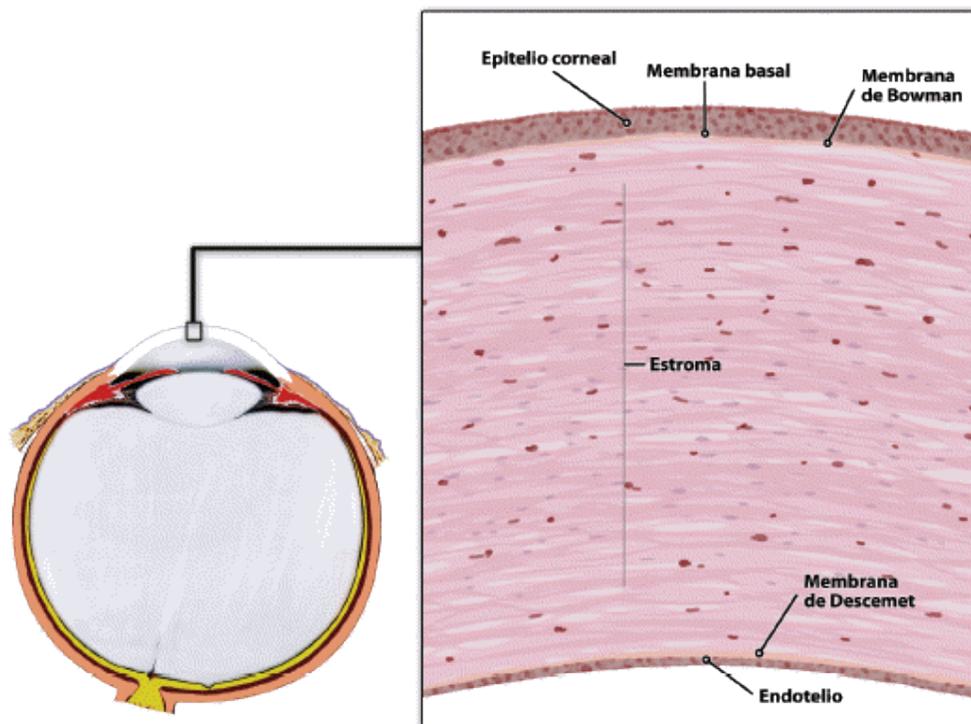
### 3. Marco Teórico

delante de la cámara anterior (Moore, 1989).

La córnea es una estructura avascular que se encuentra en la parte anterior del ojo, está rodeada de fluidos de las cuales de la parte anterior se encuentra las lágrimas y de la parte posterior el humor acuoso; representa una sexta parte de la circunferencia del ojo, tiene una forma oval y su principal función es la de permitir la transmisión de la luz. En conjunto con el cristalino ayuda a la focalización de las imágenes en la retina. En consecuencia es el lente de mayor poder refractivo del sistema ocular (Meek *et al.*, 2003); constituyendo las dos terceras partes de la refracción total del ojo.

La segunda función importante de la córnea consiste en proteger el iris y el cristalino de posibles lesiones e infecciones (Daniels *et al.*, 2006).

La córnea está compuesta por 5 capas (ver Figura 3) que desde su superficie anterior a la posterior son: epitelio (50-100  $\mu\text{m}$  de espesor), membrana de Reichert-Bowman (12  $\mu\text{m}$  de espesor), estroma (450  $\mu\text{m}$  de espesor), membrana de Descemet (4-10  $\mu\text{m}$  de espesor) y endotelio (5  $\mu\text{m}$  de espesor), (Villa *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Estructura anatómica de la córnea. Se muestran la ubicación de las principales capas que conforman a la córnea humana, epitelio corneal, Membrana basal, Membrana de Bowman, Estroma, Membrana de Descemet y Endotelio. Imagen modificada de Fernández *et al.*, 2008.

### 3. Marco Teórico

El epitelio corneal es una barrera físico-dinámica que previene la entrada de agentes deletéreos hacia el espacio intraocular. Está conformada por células escamosas, células centrales suprabasales y una sola capa de células basales columnares interiores. Las células diferenciadas escamosas tienen en su superficie microvellosidades que ocupan de 1-3 capas exteriores del epitelio, en donde su función es incrementar el área superficial celular permitiendo una mayor área de contacto con la lágrima, formado así estrechas uniones de alta resistencia proporcionando una barrera protectora (Klyce, 1972).

El estroma es un tejido mesenquimal derivado de las crestas neurales, la densidad del estroma conforma el 90% del espesor de la córnea, mientras que el arreglo paralelo de las lamelas formado a partir de complejos de heterodímeros de colágeno tipo I y V mantienen la transparencia (Fini *et al.*, 2005). Estas fibras de colágeno llevan a cabo un patrón espaciado y uniforme por parte de los proteoglicanos, mientras que los queratinocitos (fibroblastos) están localizados entre las láminas (Hay *et al.*, 1979). Estos queratinocitos escasamente situados, se enlazan en un proceso dendrítico (Muller *et al.*, 1995), donde producen proteínas cristalinas para mantener la transparencia corneal (Jester *et al.*, 1999). Desde hace una década se ha reportado la sospecha de una población de CT de queratinocitos en el estroma anterior (Du *et al.*, 2005; Funderburgh *et al.*, 2005), la estimulación de estas posibles CT del estroma pueden ser utilizadas para generar células epiteliales corneales. (Hashmani *et al.*, 2011).

La membrana de Descemet descansa sobre la superficie interna de la córnea, ésta actúa como una membrana basal para la monocapa interna de células endoteliales. Estas células transportan nutrientes desde el humor acuoso al estroma y al mismo tiempo bombean el exceso de agua, previniendo un edema corneal manteniendo una hidratación óptima (Kaufman *et al.*, 2011).

Algunas de las enfermedades que afectan a la córnea impactan directamente a su transparencia, llevándola a su opacificación, clínicamente este proceso es

### 3. Marco Teórico

denominado como leucoma y se deriva de diferentes causas: traumas de nacimiento, anomalías del desarrollo embrionario, cicatrices de heridas corneales, úlceras corneales cicatrizadas, pérdida de CTCL entre otras (Khurana ,2014).

La condición transparente de la córnea es debida a la total ausencia de vasos sanguíneos en su interior, si ocurre una neovascularización es síntoma de alguna anomalía o enfermedad de la misma.

Al tratarse el epitelio corneal de un epitelio de descamación, su renovación, generación y mantenimiento pudo ser explicada por medio de un modelo tridimensional propuesto por Thoft *et al.*, en 1983, la hipótesis (X,Y,Z) de la regeneración corneal, la cual consiste en que el proceso de “regeneración” de la córnea, existen una adición de las células basales (eje X) y la migración centripeta de las mismas (eje Y), esta adición está en balance con el número de células epiteliales perdidas a través de la descamación en la superficie corneal (Eje Z) (West *et al.*,2015), posterior al reporte de Thoft; se calculó la velocidad de la migración centripeta de las células epiteliales (123  $\mu\text{m}$ /semana) y su ciclo de vida aproximado, siendo un estimado de 7 días (Hanna & O’Brien, 1990).

### 3.5 Células Troncales Epiteliales Limbales (CTEL)

La integridad de la córnea, su transparencia y su función dependen de la capacidad de renovación del epitelio corneal y a su vez, esta capacidad de renovación depende de la población de CT localizadas en la región basal del limbo (CTEL). Anatómicamente, el limbo posee características del epitelio corneal y del epitelio conjuntival, adquiriendo características como zona de transición entre los dos diferentes tejidos (Osei-Bempong *et al.*, 2012).

Debido a las características del limbo, se formuló la hipótesis de que las CTCL residían en un micro ambiente especializado ó nicho, el cual regula su mantenimiento, su auto-renovación, su proliferación y su activación mediante

señales externas (Davenger & Evensen, 1971).

En el 2005 Dua *et al.*, identificaron la estructura anatómica en donde residen las CTEL, la cual fue llamada cripta epitelial del limbo, que se extienden en las empalizadas de Vogt, bajo estas criptas existe una extensa red vascular, a través de la cual, las CTEL reciben factores y citocinas reguladoras para llevar a cabo la proliferación y diferenciación celular. Su distribución en el limbo humano no es homogénea, siendo más abundantes en la región inferior y superior que en las regiones nasal y temporal (Daniels *et al.*, 2006).

Las CTEL comparten características similares con otras CT somáticas, incluyendo su tamaño pequeño (Romano *et al.*, 2003), su elevada relación núcleo-citoplasma (Chen *et al.*, 2004), su ciclo celular sosegado (Barrandon *et al.*, 1987) y un núcleo rico en heterocromatina con nucléolos no diferenciados (Kuparkus *et al.*, 1990).

Actualmente no existe un marcador biológico definitivo para la identificación de las CTEL, sin embargo es necesario contar con evidencias indirectas, tales como carecer de la expresión de marcadores de diferenciación como citoqueratina 3 y 12; los cuales son marcadores específicos para células epiteliales corneales. (Pajoohesh-Ganji & Stepp, 2005).

En los últimos años se han propuesto la presencia de diferentes marcadores de indiferenciación celular para separar a las CTEL del resto, dentro de los más destacados se encuentran:

#### **ABCG2**

La proteína de transporte del cassette de unión al ATP Subfamilia G miembro 2 ha sido propuesta como un marcador universal de CT y por ende un marcador de CTEL ya que Zhou y su grupo de investigadores, encontraron la expresión de ABCG2 en células troncales de Médula Ósea, músculo esquelético y en CT embrionarias (Zhou *et al.*, 2001). Además de reportarse la expresión de ABCG2 en una población de células limbales basales, pero no en poblaciones de células

### 3. Marco Teórico

epiteliales corneales, sugiriendo que es un marcador para las CTEL (Watanabe *et al.*, 2004; Shortt *et al.*, 2007).

#### **p63**

El factor de transcripción **p63** que fue propuesto como marcador de CTEL por Pellegrini en el 2001, en el que se reporta que dentro de la córnea, el p63 nuclear es expresado por las células basales del epitelio limbal, pero no se expresa en las células amplificadas en tránsito (TAC, del inglés Transit Amplifying cells) que cubren la superficie de la córnea (Pellegrini *et al.*, 2001).

Por otro lado se evaluó su ausencia en ratones knockout (p63<sup>-/-</sup>), donde éstos tuvieron defectos importantes en su desarrollo epitelial, además de carecer de epitelio estratificado. Estos resultados sugieren que p63 está implicado en el mantenimiento de la población de CTEL (Yang *et al.*, 1999).

En los últimos años se ha usado la isoforma alfa de p63, ya que se demostró que es mucho más específica que otras isoformas, comprobando que es necesaria para el mantenimiento del potencial proliferativo de las CTEL y su capacidad de migración hacia la córnea (Di Iorio *et al.*, 2005).

## 3.6 Células Amplificadoras en Transito

Las CTCL a pesar de ser CT unipotentes; en condiciones ideales, se pueden dividir simétricamente, para auto renovarse y asimétricamente dando origen a una población de células intermedias progenitoras/precursoras llamadas células amplificadas en tránsito, una vez dividida; la célula amplificada en tránsito va a migrar del nicho para entrar en una vía de diferenciación bajo la influencia de diferentes estímulos (Tseng, 1989). Estas células no son capaces de autoreplicarse, poseen una capacidad proliferativa limitada y un restringido potencial de diferenciación (Mort *et al.*, 2012).

Una de las principales funciones de esta población intermedia, es incrementar (amplificar) el número de células diferenciadas por cada división asimétrica de las CT, resultando en una división finita hasta que se conviertan en células completamente diferenciadas. Siendo el resultado final, la generación de un amplio número de células maduras del mismo fenotipo. Las TAC's provenientes de la división de las CTCL, migran centripetamente para poblar la región basal del epitelio corneal (Hsu *et al.*, 2014).

## 3.7 Enfermedades la córnea y aplicaciones a la medicina generativa

La deficiencia de CTEL genera la falta de transparencia y funcionalidad de la córnea humana; esta deficiencia de CTEL puede ser debida a diferentes causas, desde enfermedades, lesiones físicas, químicas, aniridia, y síndrome de Steven Johnson entre otros (Ramos *et al.*, 2015).

A nivel mundial, se ha reportado que existen 285 millones de personas con discapacidad visual, de las cuales 39 millones son de casos de ceguera total y 246 millones presentan visión baja (OMS, 2010). Dentro de estos casos entra la ceguera mono-ocular debido la deficiencia de CTEL en humanos, para los que no existe tratamiento farmacológico que regenere la córnea (Ahmad *et al.*, 2010).

Son pocos los grupos de investigación a nivel mundial que están intentando desarrollar un sistema de cultivo basado en ingeniería de tejido y biopolímeros para eliminar el uso de membrana amniótica en la producción de CTEL con potencial uso en terapias de regeneración de córnea en humanos. Los reportes más recientes a nivel experimental incluyen el uso de plásticos de cultivo con características dependientes de temperatura (Watanabe *et al.*, 2007), plásticos comprimidos (Levis *et al.*, 2010), polímeros unidos a membrana amniótica (Ma *et al.*, 2010) e hidrogeles basados en proteínas naturales ligados en forma de red con polímeros sintéticos u otras proteínas como ácido hialurónico con poli-aspartamida (Fiorica *et al.*, 2011) y recientemente colágeno con riboflavina (Mi *et al.*, 2011).

## 4. Antecedentes

Existen reportes en terapia celular para revertir la deficiencia de CTEL; todos basados en la expansión *in vitro* de las CTEL. Algunos reportes utilizan como estrategia, el co-cultivo de CTEL con células de fibroblasto de ratón embrionario '3T3', otros emplean membrana amniótica como soporte directo para el cultivo de CTEL (Shortt *et al.*, 2008).

Pellegrini *et al.*, en 1997 reportó por primera vez uso de CTEL para su expansión por cultivo *in vitro* y su aplicación en terapia celular para tratar la deficiencia corneal de CTEL. Esta técnica es la base de la aplicación clínica directa después de un cultivo *in vitro*, en ella utilizaron una monocapa de células '3T3' de fibroblasto embrionario de ratón (como células alimentadoras) con el fin de mimetizar el nicho en el que se encuentran las CTEL en su estado natural (Pellegrini *et al.*, 1997).

A pesar de haber pasado más de una década del primer reporte clínico la metodología sigue siendo similar, esto es debido a que no se ha reportado ningún efecto adverso por el uso de las células '3T3' de ratón como co-cultivo con las CTEL aplicadas en terapia celular a humana. Tal es el caso de Shortt *et al.*, que en 2008, hacen uso de membrana amniótica como soporte directo para el cultivo de CTEL obtenidas a través de una pequeña biopsia autóloga del paciente (2 a 3 mm).

El uso de membrana amniótica como soporte para el cultivo de CTEL representa varias desventajas como variación biológica entre donadores de membrana amniótica, costosos procesos de análisis para garantizar que la membrana esté libre de agentes patógenos (principalmente virus) y evitar el potencial riesgo de contaminación al producto final (CTEL).

Uno de los mayores retos que enfrenta el desarrollo de terapias celulares es su

#### 4. Antecedentes

cultivo y óptima expansión que permita generar cantidades suficientes de células con el fenotipo y genotipo correcto para su trasplante (Mondragón-Teran et al., 2011), así como su derivación en medios de cultivo químicamente definidos y libre de contacto con otro tipo de células que puedan comprometer la seguridad y eficacia del tratamiento (Mondragón-Teran et al., 2009).

Se han desarrollado protocolos para el aislamiento de CTCL sin la necesidad de utilizar membrana amniótica y/o co-cultivo con fibroblastos embrionarios de ratón, tal fue el caso de Li et al., en el 2005 reportaron una manera de aislar una población humana de CTCL (a partir de anillos esclero-corneales), utilizando placas de cultivo pre-tratadas con Colágeno tipo IV. Su método de separación celular se basó en los tiempos adherencia al Colágeno IV, así mismo hicieron uso de los marcadores de troncalidad (p-63, ABCG2). Como resultados obtuvieron que las células que presentaron una rápida adherencia fueron positivas para p-63, integrina  $\beta 1$  y ABCG2 (marcadores de las CTCL).

Luna-Baca et al., en el 2005, mediante el uso de explantos muestran los inmunofenotipos de las células epiteliales limbales, extraídos de rodetes esclero-corneales de donadores mexicanos, cultivadas con medios ricos en suero fetal bovino y extracto de pituitaria.

Daniels et al., en el 2006 dataron que el uso de colágeno tipo I como una ME, permite una separación de las diferentes líneas provenientes del tejido humano, debido a una afinidad al sustrato durante las primeras horas del cultivo.

En función de caracterizar los componentes de la ME y el rol de la membrana basal en la generación del microambiente del nicho de las CTCL, Schlötzer-Schrehardt et al., en el 2008 analizaron las variaciones topográficas de la membrana basal de la superficie epitelial ocular humana, hallando componentes uniformemente expresados a través de toda la superficie del epitelio ocular, siendo

#### 4. Antecedentes

colágeno tipo IV,VII,XV,XVII, XVIII, Laminina , Fibronectina, Matrilina y Perlecan las proteínas más abundantes (Schlötzer,2007).

Mei *et al.*, en el 2012 afirma que el nicho de las CTEL juega un papel importante en la homeostasis celular, siendo la ME un elemento importantes por su capacidad de brindar soporte estructural y mecánico, regular las funciones como adhesión, migración proliferación, auto-renovación y diferenciación. En su revisión bibliográfica cita a las proteínas que se localizan dentro del limbo esclero-corneal, las cuales los separa por Colágenos (I, III, IV, V, VII, XV, XVI, XVII, XVIII), glicoproteínas (Fibronectina, Laminina y Trombospodina) y proteoglicanos (Perlecan). Sugiriendo Fibronectina, Laminina, Colágeno tipo I, III y IV como las proteínas idóneas para re-cubrir a los pozos de cultivo.

La alternativa basada en uso de biopolímeros deberá presentar características de soporte que permitan a las CTEL proliferar, producir ME y que les permita también contacto célula-célula y célula- ME, por eso es necesario una expansión selectiva de CTEL recreando un nicho *ex vivo*.

# 5. Justificación

A pesar de que existen avances en investigación de terapias celulares para la regeneración del epitelio corneal; el aislamiento y expansión de las CTEL en matrices químicamente definidas aún no ha sido reportado. El uso de proteínas como parte del diseño de un andamio que mimetice el nicho y ayude con la expansión selectiva de las CTEL es necesario para que en un futuro sea posible su aplicación terapéutica en medicina regenerativa.

# 6. Hipótesis

El uso de una proteína base como soporte y de medios químicamente definidos para el cultivo de CTEL, nos permitirá su aislamiento y una expansión selectiva conservando su fenotipo y su troncalidad.

## 7. Objetivos

### 7.1 Objetivo principal

❖ Investigar el efecto del uso de diferentes proteínas (Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I y Colágeno IV) como ME durante la expansión de Células Troncales Epiteliales Limbales.

### 7.2 Objetivos particulares

- ❖ Derivar quirúrgicamente tejido esclerocorneal a partir de modelo animal (conejo).
- ❖ Realizar una expansión *in vitro* de CTEL en un medio libre de células alimentadoras.
- ❖ *Determinar las características fenotípicas de las CTEL de conejo cultivadas In Vitro.*
- ❖ Evaluar la expansión celular en diferentes tipos de proteína como ME.

## 8. Materiales y Métodos

### 8.1 Extracción de rodetes esclero-corneales

Los modelos animales, conejos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, adultos, Nueva Zelanda, con un peso promedio de  $1,500 \pm 200$  gramos, se adquirieron en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV), Tláhuac, D.F. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Una vez hecha la adquisición los ejemplares se trasladaron al bioterio del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE, en donde ya se contaban con conejeras para su estancia (ver figura 4A).

El proceso de eutanasia y extracción de rodetes esclero-corneales se realizó en la sala quirúrgica de Medicina Experimental ubicada en el 3<sup>er</sup> Piso de la Unidad de Investigación del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE. Una vez en la sala quirúrgica, se tomaron a los ejemplares y se les aplicó una inyección intraperitoneal de Pisabental en una dosis de 90 mg/kg de peso corporal, se esperó a que el ejemplar dejara de respirar (Figura 4B).

Una vez confirmada la eutanasia se emplearon clips modificados en forma de blefaróstato aunados a una liga con la finalidad de evitar la regresión de parpados a su estado original, esto facilitó el acceso al globo ocular, permitiendo el manejo del ejemplar con (ver Figura 4C).

Antes de hacer uso de las tijeras corneales corneales (Stallion, USA) se hizo una incisión con ayuda de una hoja de bisturí del #16, en la región inferior nasal/inferior, se escogió esta área porque permite acceder mejor a la zona temporal. El uso de tijeras corneales con punta dirigida hacia la izquierda facilitó la extracción del anillo esclero-corneal. Durante el procedimiento, no se permitió que el globo ocular se secase y para esto se humedecía continuamente con unas gotas de solución de Hank's adicionada con 1% antibiótico.

## 8. Materiales y Métodos

Los 20 rodetes se colocaron de forma inmediata en tubos estériles Falcon de 15 ml con solución de Hank's adicionada con 1% antibiótico, manteniéndolas a 8°C, para su traslado al Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos ubicada en el 3<sup>er</sup> Piso en la Unidad de Investigación Biomédica del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE.



**Figura 4.** *Proceso de extracción de rodetes esclero-corneales.* A) Ejemplares en conejeras dentro del bioterio del CMN "20 de Noviembre" B) Proceso de Anestesia-Eutanasia C) Extracción del anillo esclero-corneal D) Transporte de muestras.

### 8.2 Descontaminación

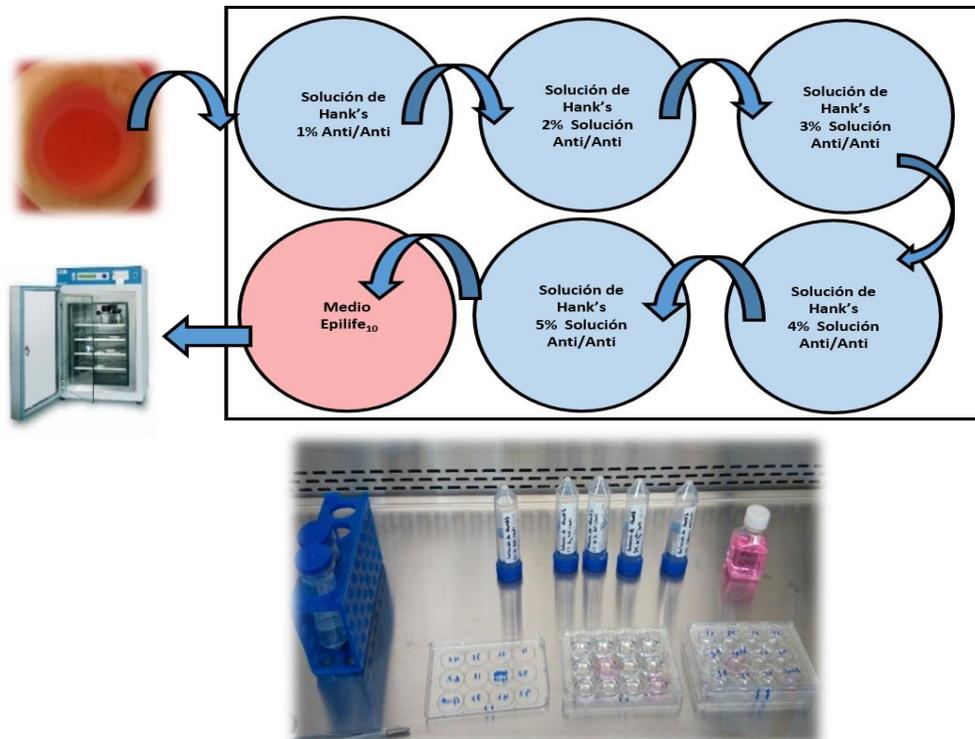
Después de la extracción se realizó un proceso de descontaminación de las muestras, el cual consistió en exponer durante 5 minutos el rodete esclerocorneal en solución de Hank's en diferentes concentraciones de solución de Penicilina/Estreptomicina (1%, 2%, 3%, 4% y 5%); enseguida se sumergió en medio Epilife<sub>10</sub> (Gibco, USA) durante 10 minutos (Figura 5). Se retiró el tejido y se colocó de nuevo en refrigeración. Finalmente el medio del cual fue retirado el

## 8. Materiales y Métodos

rodete esclero-corneal se colocó en una incubadora designada para cuarentena, en cultivo por un lapso de 72h con la finalidad de descartar una posible contaminación.

Con la finalidad de evitar contaminaciones cruzadas entre rodetes-esclerocorneales cada uno fue transferido con una pinza estéril independiente.

Una vez transcurrido el tren de descontaminación, se colocaron los medios de cultivo en un pozo de cultivo para su exploración en el microscopio invertido, al no notar alguna anomalía la placa de cultivo fue transferida a la incubadora designada como cuarentena.



**Figura 5.** Esquema del proceso esterilización. Se muestra el tren de esterilización que se llevó a cabo a los 20 rodetes esclero-corneales.

Se revisaron los pozos a las 24, 48, y 72 h. El viraje del color del medio, la presencia una capa turbia en la superficie ó la presencia de agentes microbianos detectados bajo la exploración del medio de cultivo en el microscopio fueron las señales de contaminación.

### 8.3 Aislamiento y cultivo de las CTCL

Antes de iniciar el proceso de aislamiento celular, se lavaron los tejidos con DPBS sin Magnesio ni Calcio (Gibco, USA). De la parte anterior de los rodetes esclero-corneales se eliminaron los restos de iris y de membrana de Descemet, con la ayuda de una hoja de bisturí del #20 y de unas pinzas entomológicas estériles, una vez retirados los tejidos, se realizaron 3 lavados más con DPBS. Para aislar a las CTCL de conejo, se realizó un tratamiento enzimático de los rodetes esclero-corneales con 2.5 mL de Dispasa a una concentración de 2U/mL (Gibco, USA). El tratamiento enzimático se realizó durante 2h a una temperatura de 37°C. Posteriormente se continuó con una técnica de separación mecánica con ayuda de una hoja de bisturí del #16, la técnica consistió en raspar gentilmente el área del limbo esclero-corneal de forma centrípeta, las células obtenidas del procedimiento fueron recuperadas en PBS (Gibco, México). El extracto fue centrifugado a 800 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Finalmente el pellet se resuspendió en un medio químicamente definido (Medio Epilife<sub>10</sub>, ver Anexo 1) adicionado con HCGS (Gibco, USA). Se utilizaron como ME las proteínas base Laminina (Gibco, USA), Fibronectina (Gibco, USA), Colágeno tipo I (Stem Cell Technologies, USA), y Colágeno tipo IV (BD Bioscience, México), a una concentración de 50µg·mL<sup>-1</sup> para todos los casos; se incluyó la ausencia de proteína base como control.

Se establecieron los siguientes tiempos de evaluación del cultivo: 168h (7 días), 216h (9 días), 288h (12 días) y 360h (15 días).

El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas. La expansión celular se realizó en condiciones de cultivo estándar (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

### 8.4 Inmunocitoquímica

Se investigó el inmuno-fenotipo de las células cultivadas, a través de inmunocitoquímica para identificar la presencia de los anticuerpos primarios CK3 y P63- $\alpha$  (marcadores para las células epiteliales y CTCL respectivamente).

Se fijaron las muestras a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, después se colocó solución permeabilizadora (PBS adicionado con 0.05% de Triton X-100) durante 25 min., se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Se procedió a colocar solución de bloqueo compuesta de 5% de suero de cabra (Invitrogen, USA), 0.25% de Tritón X-100 (Sigma; USA) en PBS durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Posteriormente se procedió a realizar el inmuno-marcaje con los anticuerpos primarios CK3 (Millipore, México) dilución 1:200 y P63- $\alpha$  (Abcam, UK) dilución 1:100, durante 1h a temperatura ambiente ó durante 12h a 8°C. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Se colocaron los anticuerpo secundarios con el fluorocromo FITC (Abcam, USA) dilución 1:200 y Alexa Fluór 488 (Abcam, USA) dilución 1:100 durante 1h a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con PBS.

Por último se identificó la presencia o ausencia de los anticuerpos primarios (Citoqueratina 3 y P63- $\alpha$ ) con la ayuda de un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX71. El núcleo se identificó por incubación de las muestras con DAPI a una concentración de 300mM.

### 8.5 Evaluación de la expansión celular

Se realizó un conteo celular manual con el uso de las microfotografías adquiridas por medio de la técnica de inmunocitoquímica, en donde se identificaron a las CTEL (P63- $\alpha$ +) y a las células epiteliales (CK3+) en un área determinada. Se evaluó la diferencia del número total de células identificadas con los inmunofenotipos antes mencionados para cada uno de los tiempos establecidos (se tomó en cuenta la microfotografía con DAPI, como el valor total de células).

### 8.6 Evaluación de Pureza

Se evaluó la pureza de los cultivos, mediante el análisis de las microfotografías obtenidas, se tomó como el 100% de la población el conteo de todos los núcleos celulares teñidos con DAPI; el número total de células que co-localizaron con el anticuerpo deseado (CK3 ó p63- $\alpha$ ) fue dividido entre el número total de células teñidas con DAPI; el resultado se multiplicó por 100 y para obtener el porcentaje de pureza.

### 8.7 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva, utilizando la prueba de t de Student para dos muestras no pareadas. La diferencia significativa se consideró con una  $p < 0.05$  y se utilizó el programa Excel de Microsoft.

### 8.8 Registro institucional del proyecto

Para la realización de este estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Investigación Científica del Comité de Bioseguridad y de la Comisión de Ética del C.M.N. “20 de Noviembre – ISSSTE” con el número **008.2012** (Ver Anexo 2).

### 8.9 Aspectos éticos

Los conejos que se utilizaron en este protocolo de investigación, fueron manejados siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-Z00-1999, la cual refiere a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Así mismo se llevaron a cabo derivaciones preliminares utilizando tejido esclerocorneal remanente de trasplante de córnea humano (ver anexo 3), cumpliendo así con lo establecido en la Ley General de Salud art. 342. En donde se cita:

**Art. 342.-** Cualquier órgano o tejido remanente de una cirugía será considerado como desecho y la institución responsable de su resguardo podrá remitirlo a instituciones docentes autorizadas para realizar investigación.

### 8.10 Aspectos de bioseguridad

Como procedimiento de rutina para el banco de ojos del el servicio de oftalmología y trasplante de córneas del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE y del Instituto de Oftalmología F. A. P. Conde de Valenciana I. A. P., se realizó una batería de análisis a los tejidos donados (VIH y Virus de la hepatitis B y C), conservando solo aquellos que son negativos para dicha batería de análisis.

Dentro del laboratorio se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones de bioseguridad:

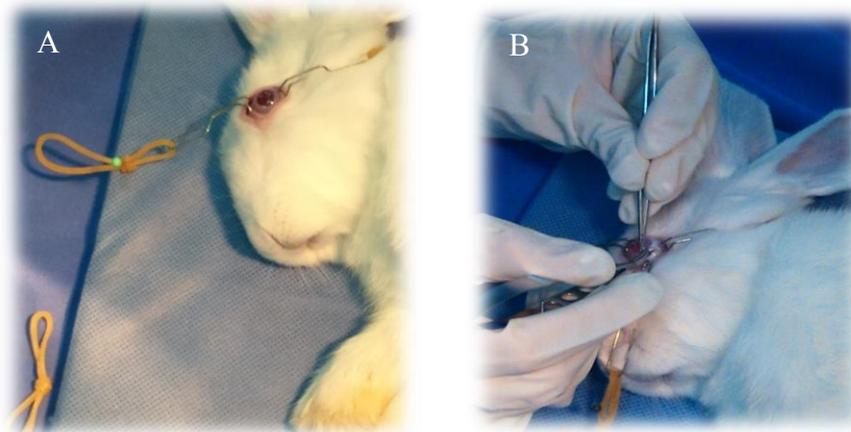
1. Lavado de manos antes y después de cada procedimiento.
2. Ventilación e iluminación adecuada de ambientes.
3. Uso de guantes, mascarillas, batas y lentes protectores.
4. Desinfección y esterilización de instrumental.
5. Manejo apropiado de material punzo cortante.
6. Limpieza y descontaminación de ambientes, muebles e implementos utilizados.
7. Manejo y eliminación segura de los desechos químicos y biológicos.
8. Prevención y atención de accidentes ocupacionales.

## 9. Resultados

Se llevaron a cabo experimentos preliminares en células aisladas de rodetes esclero-corneales humanos de 10 rodetes donados por El servicio de Oftalmología del CMN “20 de Noviembre”-ISSSTE y del Instituto de Oftalmología F. A. P. Conde de Valenciana I. A. P. (Ver Anexo 3).

### 9.1 Extracción los rodetes esclerocorneales de modelos animales

La extracción de los rodetes se llevó a cabo sin ninguna anomalía; el uso de los blefaróstatos brindó una mejor manipulación del modelo animal (ver Figura 6), el uso de tijeras corneales optimizó el tiempo de extracción.



**Figura 6.** Manipulación del modelo animal (conejo). A) Se muestran los clips en forma de blefarostato deteniendo los párpados. B) Libre acceso al globo ocular y primera incisión con el bisturí al área de la esclera.

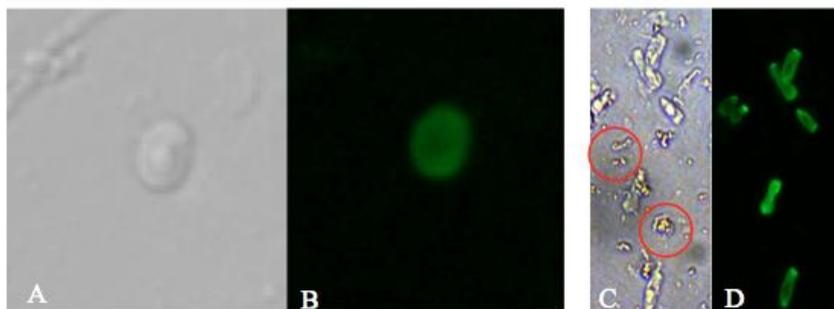
## 9.2 Descontaminación

Después de haber transcurrido las 72 h en incubación, en ningún medio de cultivo se encontró presencia de agentes bacterianos, microbianos o fúngicos, por lo que se le atribuye una buena práctica el utilizar el tren de esterilidad propuesto en futuros estudios con cultivos primarios.

## 9.3 Inmunofenotipo

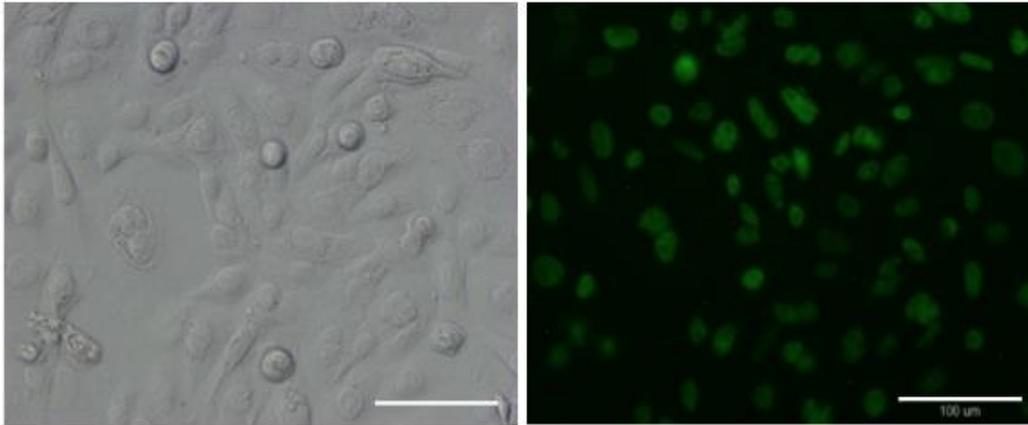
Con el uso de inmunocitoquímica, se determinaron los inmunofenotipos para los dos tipos celulares de interés: células epiteliales corneales (CK3+) y células troncales epiteliales limbales (p63- $\alpha$  +). Para cada caso, se utilizó como control negativo, células tratadas en presencia o ausencia del isotipo del anticuerpo primario y en presencia del anticuerpo secundario con su fluorocromo correspondiente. En ambos controles negativos no se observó fluorescencia.

En la Figura 7 se muestra el fenotipo de las células epiteliales corneales, las cuales se caracterizan por ser de tipo de circular. Las células se detectaron de forma aislada (forma circular) o en colonias (forma de bastón), distribuidas de manera uniforme por todo el pozo de cultivo, siendo positivas para el marcador CK3.



**Figura 7.** *Inmuno fenotipo CK3+.* A) y C) Microfotografías (10X) en campo claro, B) y D) Microfotografías (10X) se revela el fenotipo en color verde de las células positivas para CK3, por otro lado se muestra en un círculo rojo la ausencia del marcador en células.

Por otro lado en la Figura 8 se muestra el fenotipo de las CTEL ( $p63-\alpha$  +); el fenotipo de estas células es característico por su núcleo grande y de una forma tipo cuboidal (sin llegar a ser fusiforme). Su distribución en el pozo de cultivo fue uniforme, su expansión fue concéntrica y uniforme, además de observarse dos tipos de clonas holoclonas y paraclonas, siendo la última la más abundante.



**Figura 8.** *Inmunofenotipo Células Troncales Epiteliales Limbales.* En la izquierda se muestra el fenotipo en campo claro, en la derecha se muestran las células positivas a  $p63-\alpha$  en verde. Microfotografías (10X, 1.6X) escala 100  $\mu\text{m}$ .

### 9.4 Afinidad de las células epiteliales (Ck3+) a diferentes proteínas como matriz extracelular

Se determinó la afinidad de las células epiteliales a diferentes proteínas utilizadas como ME. Se documentó esta afinidad a través de microfotografías en los 4 tiempos de evaluación establecidos (7, 9, 12 y 15 días).

A continuación se muestran las inmunocitoquímicas para células epiteliales (CK3+) para cada uno de los tiempos de cultivo con las respectivas proteínas (Laminina,

Fibronectina, Colágeno tipo IV y colágeno tipo I) y la ausencia de ME. En total se adquirieron 9 microfotografías que representan al pozo de cultivo; por cuestiones de espacio, se muestran tres microfotografías para cada proteína y para la ausencia de proteína.

### 9.4.1 Afinidad de Célula Epiteliales Corneales (CK3+) a 168 h de cultivo

Se muestran las microfotografías correspondientes a 168 h de cultivo para cada una de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME. Se presentan las células positivas para citoqueratina 3, marcador específico de las células epiteliales corneales. Con la finalidad de revelar su morfología fue necesario tomar microfotografías en campo claro, DAPI, CK3+ (en verde, correspondiente a anticuerpo secundario acoplado a FITC) y la combinación de las microfotografías con DAPI y CK3+ (merge). Es importante mencionar que la citoqueratina 3, es una proteína que conforma a los filamentos intermedios del citoesqueleto; y en la foto combinada se logra apreciar el núcleo celular y el citoesqueleto de las células corneales.

La Figura 9 corresponde a la ausencia de ME, se observan células esparcidas por todo el pozo de cultivo, su fenotipo es de forma es circular y con respecto a su tamaño, se observaron diferentes diámetros celulares entre los 10 y 20 micrómetros.

En la Figura 10 el cultivo se realizó en Colágeno tipo I, observándose una menor cantidad de células CK3+, la morfología celular sigue siendo de forma circular, el diámetro celular en promedio se mantuvo entre 7 y 23  $\mu\text{m}$ .

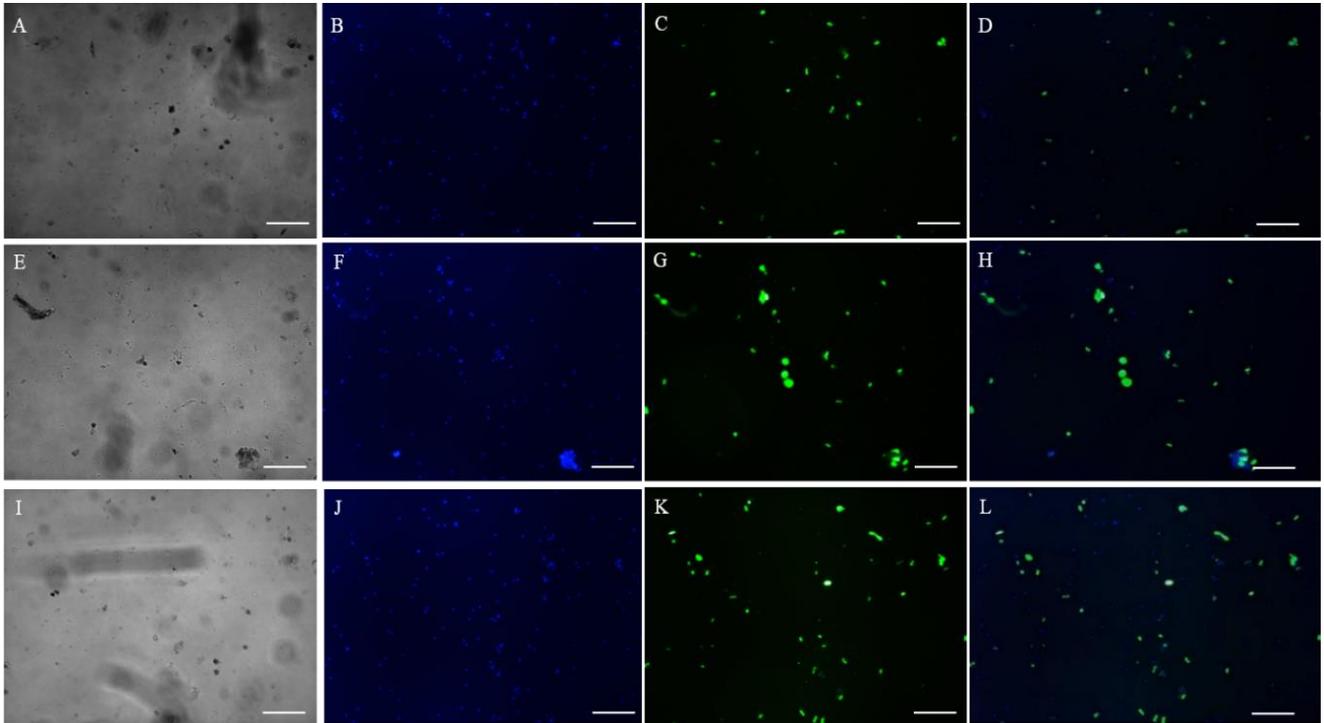
En la Figura 11 el cultivo se encuentra el cultivo utilizando Colágeno tipo IV; se observa que el crecimiento celular es en colonias, dejando grandes espacios entre ellas (Figura 10E), se presenta una morfología de forma fusiforme que no es positiva a CK3 (Figura 10 I), sin embargo las células positivas para CK3 son de

diámetros diversos, 13 a 66 micrómetros de longitud (Figura 10 C,D).

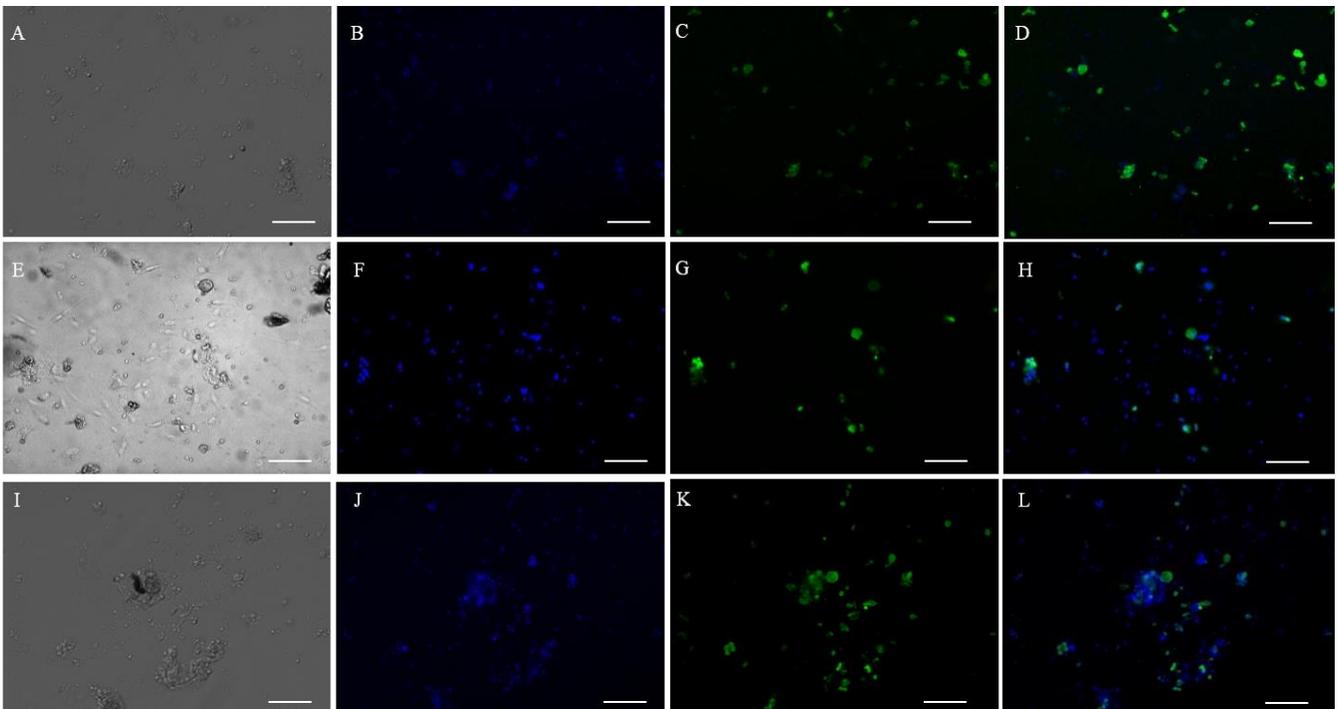
En la Figura 12 se muestran las células cultivadas sobre Laminina, morfológicamente hablando estas son parecidas a las células cultivadas en colágeno tipo I y ausencia de ME (Figuras 8 y 9); sin embargo su cantidad es menor, en este cultivo aparecen células con morfología fusiforme (Figura 11E) que no son positivas al marcador deseado.

Por último en la Figura 13, encontramos a las células que fueron cultivadas en una matriz de Fibronectina, el crecimiento es de manera disgregada, debido a que existen células distribuidas por todo el pozo de cultivo, su morfología es de forma circular y con respecto al diámetro celular, este oscila entre los 7 y los 30 micrómetros.

## 10. Discusión

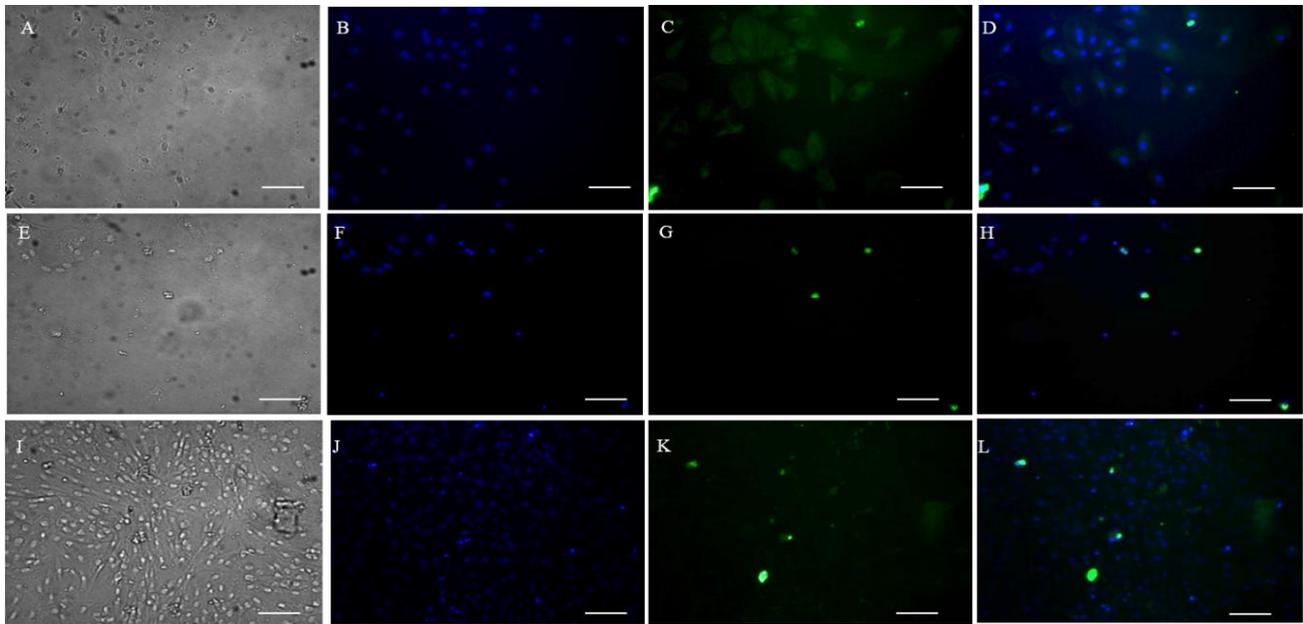


**Figura 9.** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME a 168h (7días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Combinación, de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm.

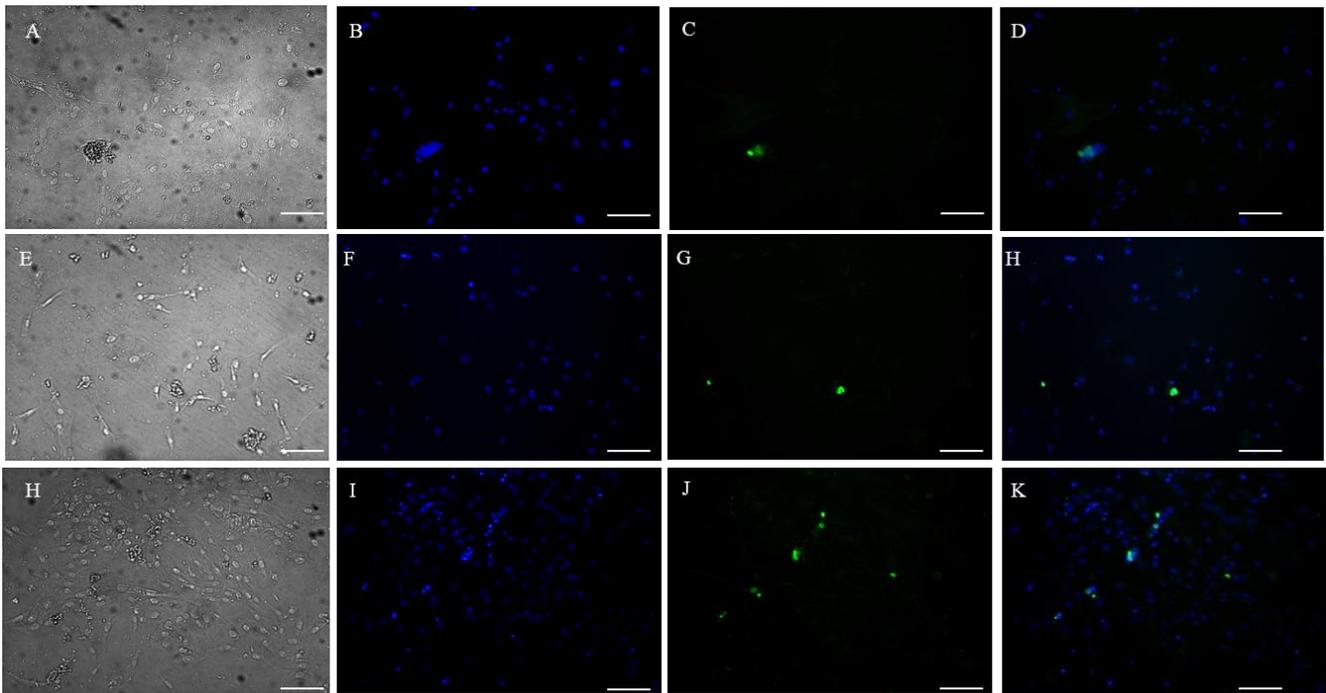


**Figura10.** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I como matriz extracelular, a 168h (7días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X) La escala representa 100µm.

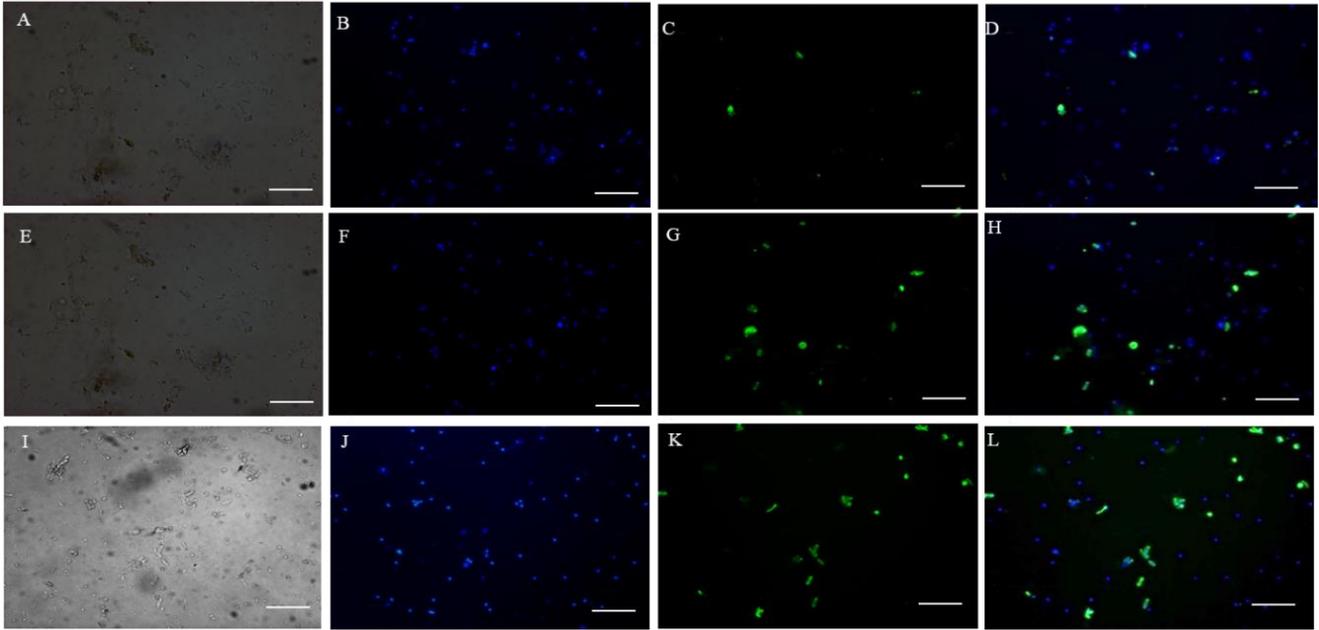
## 10. Discusión



**Figura 11** Microfotografías de inmunocitoquímica del Colágeno tipo IV como matriz extracelular, a 168h (7días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X) La escala representa 100  $\mu$ m.

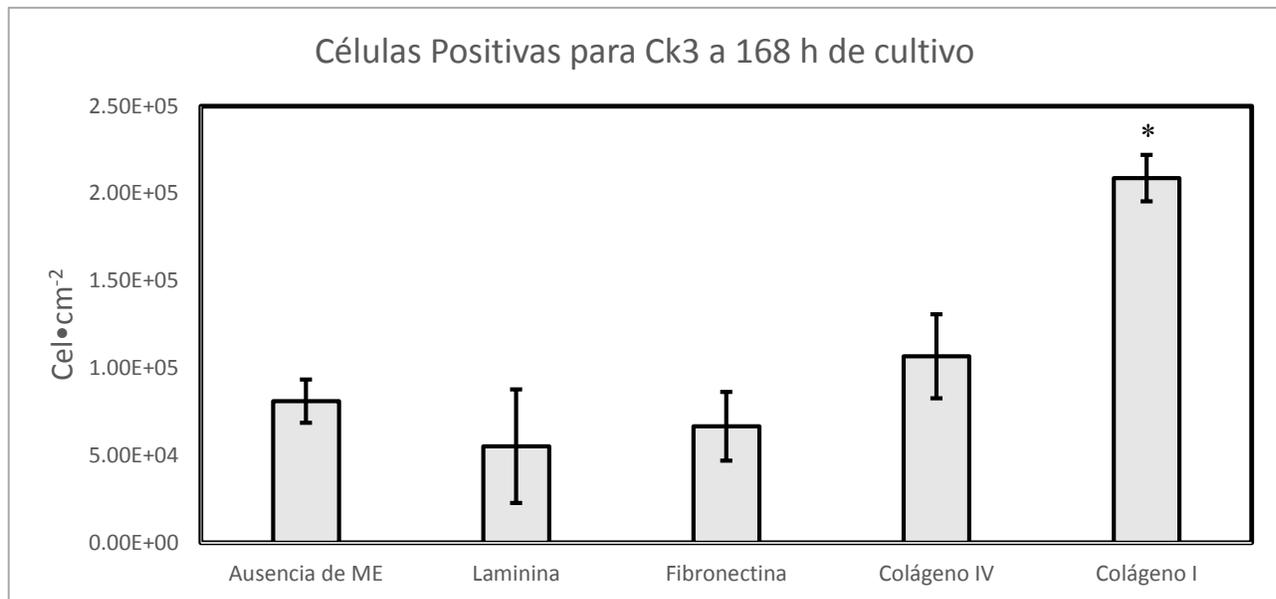


**Figura 12** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina como matriz extracelular, a 168h (7días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X) La escala representa 100  $\mu$ m.



**Figura 13.** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina como matriz extracelular, a 168h (7días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+(10X). La escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 14 se muestran el valor promedio de las células epiteliales corneales (CK3+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV y Colágeno tipo I). Se puede observar una diferencia significativa en la ME de colágeno tipo I al comparar con las demás proteínas, además de revelar una expansión de células epiteliales corneales (CK3+) aún sin ME en el pozo de cultivo.



**Figura 14.** Células positivas a CK3 a 168h de cultivo. Los valores no muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) ( $p=0.00804$ ).

#### 9.4.2 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 216 h de cultivo

En las Figuras 15 – 19 se muestran las microfotografías correspondientes a 216h de cultivo para cada uno de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME.

La Figura 15 corresponde a la ausencia de proteína como ME, se puede detectar a las células con morfología fusiforme (Figura 14 A) descrita con anterioridad; la morfología circular CK3+ también se hace presente sin embargo se observa un decremento en población.

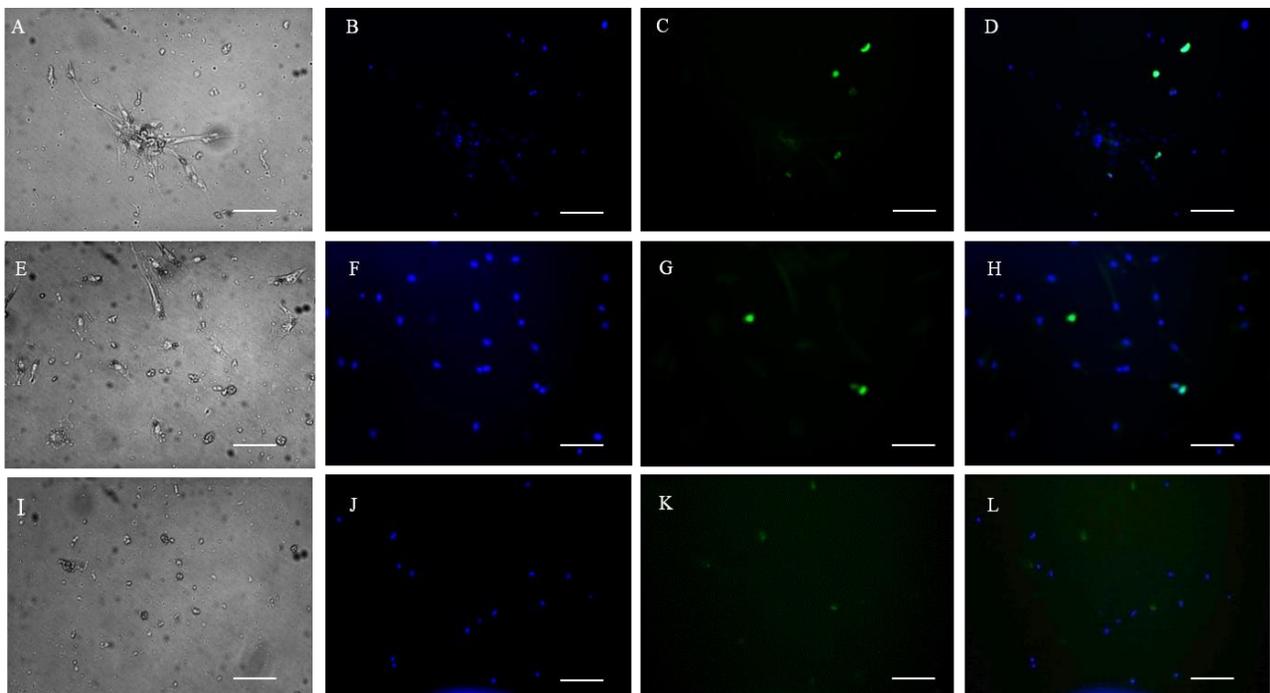
Las células cultivadas en matriz de Colágeno tipo I se encuentran en la Figura 16, al parecer existe una menor expresión de células CK3+ en comparación con el intervalo de tiempo anterior, sin embargo se sigue observando la misma morfología circular, con un diámetro celular de 7 a 24 micrómetros, además de presenciar una expansión no clonal, y una pequeña autofluorecencia.

## 10. Discusión

En la Figura 17 se presentan a las células cultivadas sobre una ME de Colágeno tipo IV, en la cual se logra apreciar un incremento en la población celular, comparado con el intervalo de tiempo anterior (Figura 10), este aumento también se vio reflejado la población de células CK3+, se perciben los diámetros celulares de 10 a 20 micrómetros.

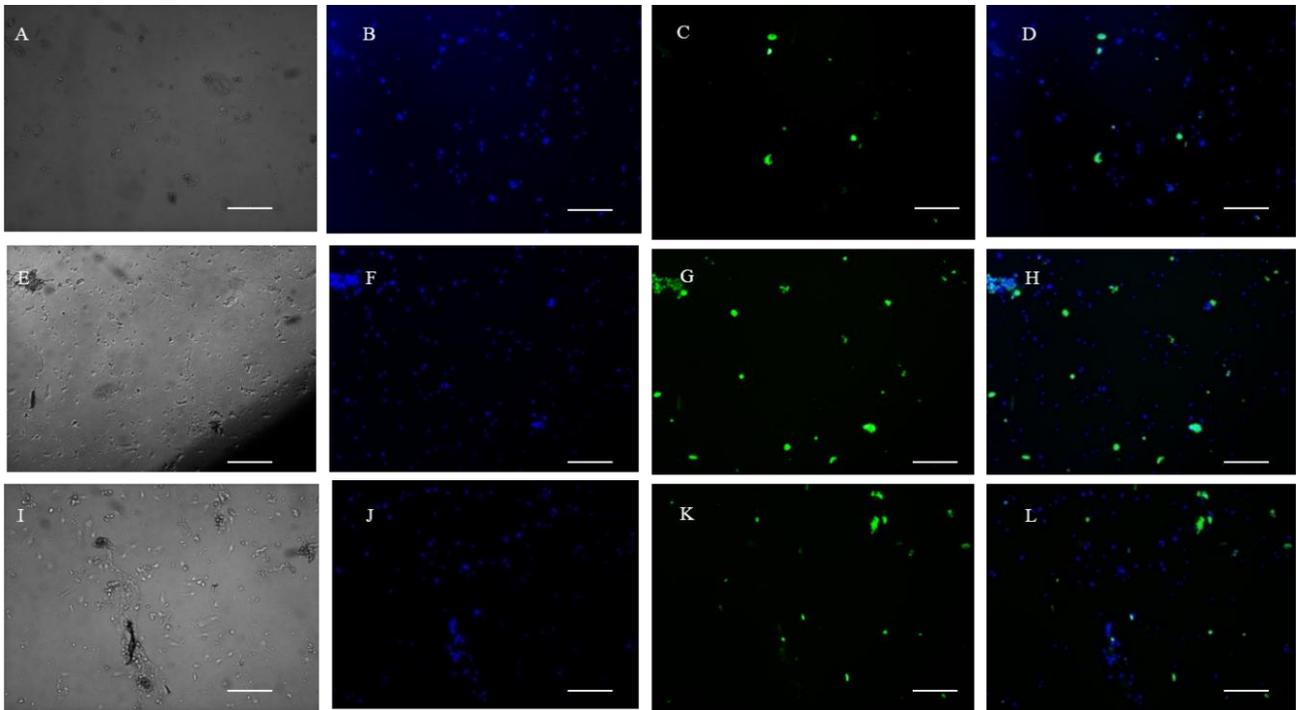
La Figura 18 muestra a las células cultivadas en Laminina como ME, se observa que existe poca cantidad del inmunofenotipo deseado (CK3+), sin embargo podemos resaltar el fenotipo circular, que empieza ser característico de este tipo de células, de igual modo el diámetro celular sigue oscilando de 7 a 20 micrómetros.

Por último tenemos la Figura 18, la cual es la representación del cultivo en Fibronectina como ME, se aprecia un incremento importante en el immuno-fenotipo deseado (CK3+), la morfología celular es circular y su expansión no es clonal.

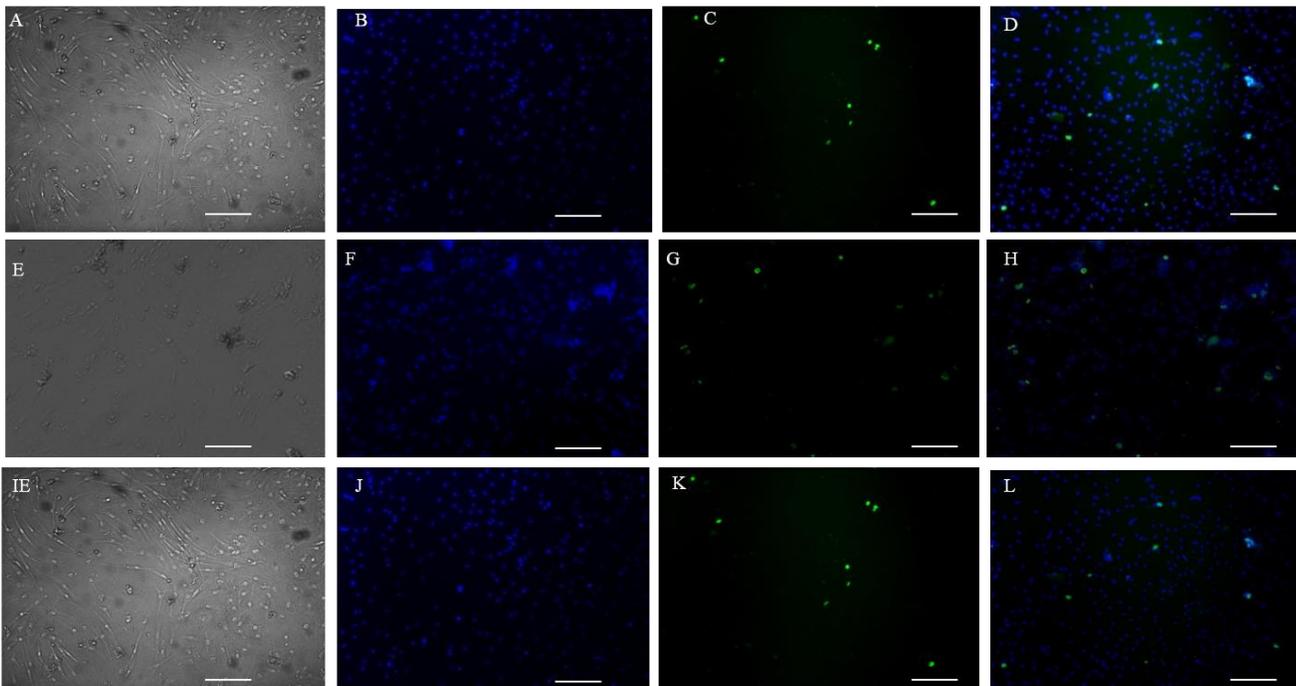


**Figura15.** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde (FITC). D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X) La escala representa 100µm.

## 10. Discusión

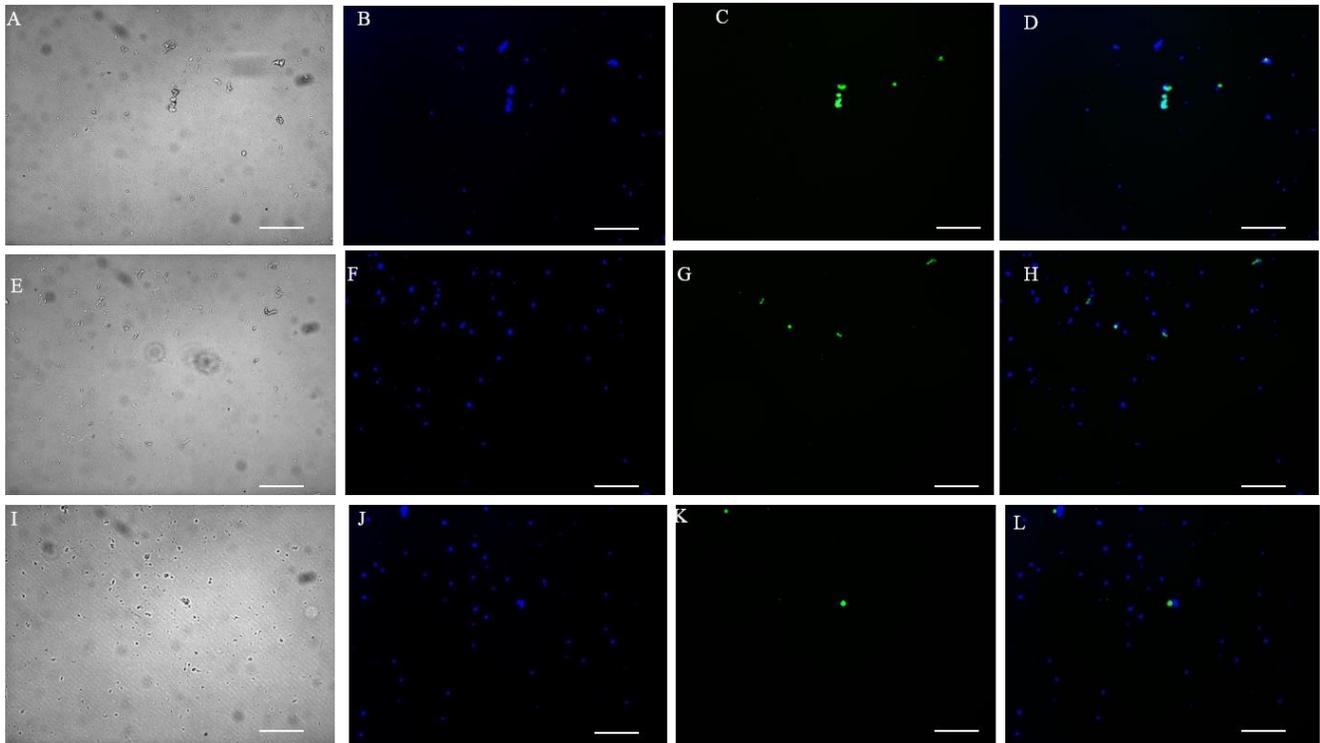


**Figura 16** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I como matriz extracelular, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde (FITC). D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm

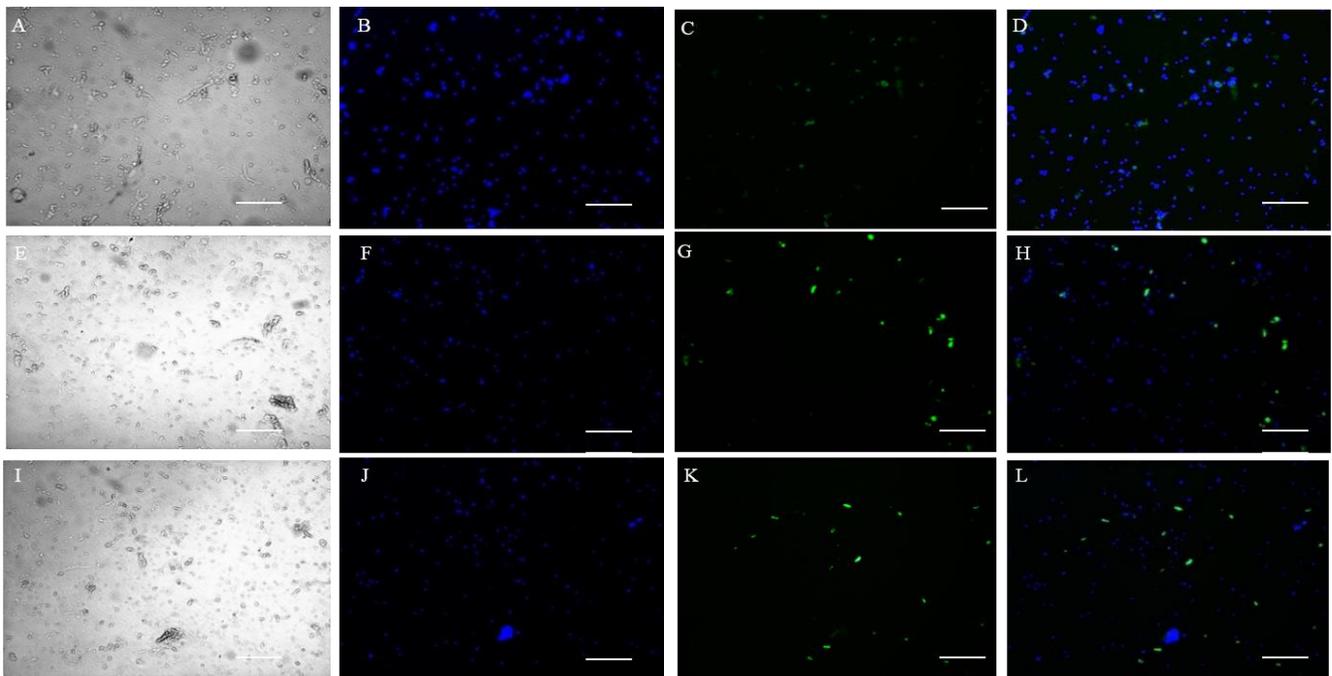


**Figura 17** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo IV como matriz extracelular, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde (FITC). D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm.

## 10. Discusión

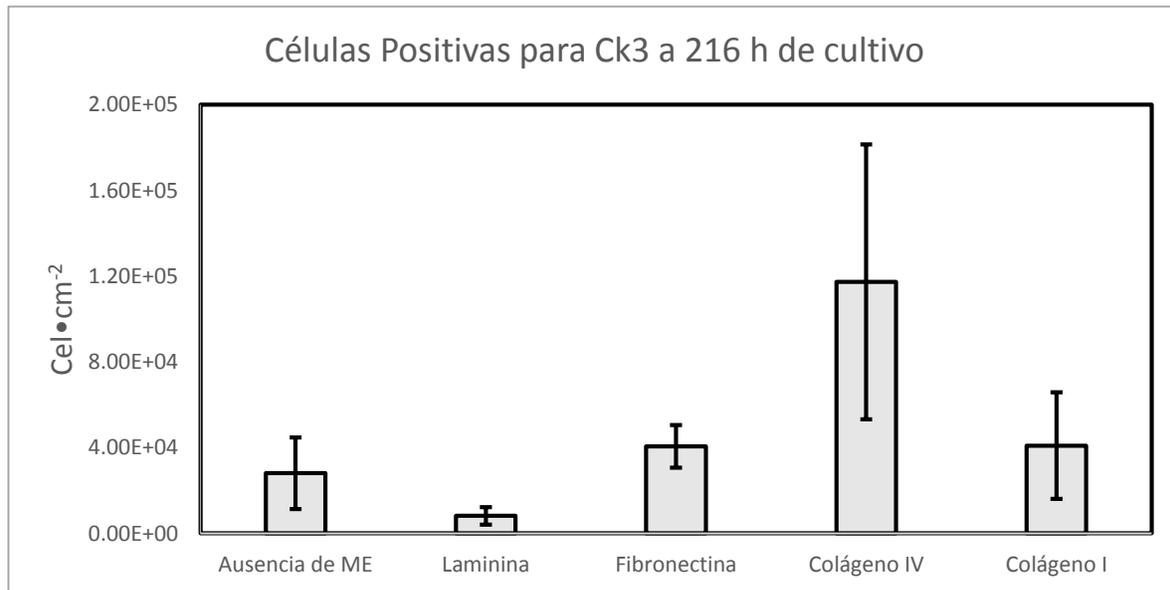


**Figura 18** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina como matriz extracelular, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde (FITC). D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.



**Figura 19** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina como matriz extracelular, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde (FITC). D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.

En la Figura 20 se muestran los valores promedio de las células epiteliales corneales (CK3+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se observa una diferencia significativa entre número total de células positivas a CK3 en la matriz de colágeno IV con respecto a la ME de laminina. ( $p= 0.00804$ ,  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 20.** Células positivas a CK3 a 216h de cultivo. Los valores muestran una diferencia estadísticamente significativa entre Colágeno IV contra Laminina ( $\alpha=0.05$ ) ( $p=0.00804$ ).

### 9.4.3 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 288 h de cultivo

En las Figuras 21 – 25 se muestran las microfotografías correspondientes a 288h de cultivo para cada uno de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME. Se detectaron las células positivas para citoqueratina 3, marcador específico de las células epiteliales corneales. Con la finalidad de revelar su morfología fue necesario tomar microfotografías en campo claro, DAPI, CK3+ (en verde, correspondiente a anticuerpo secundario acoplado a FITC) y la unión de la microfotografías con DAPI y CK3+ (merge).

## 10. Discusión

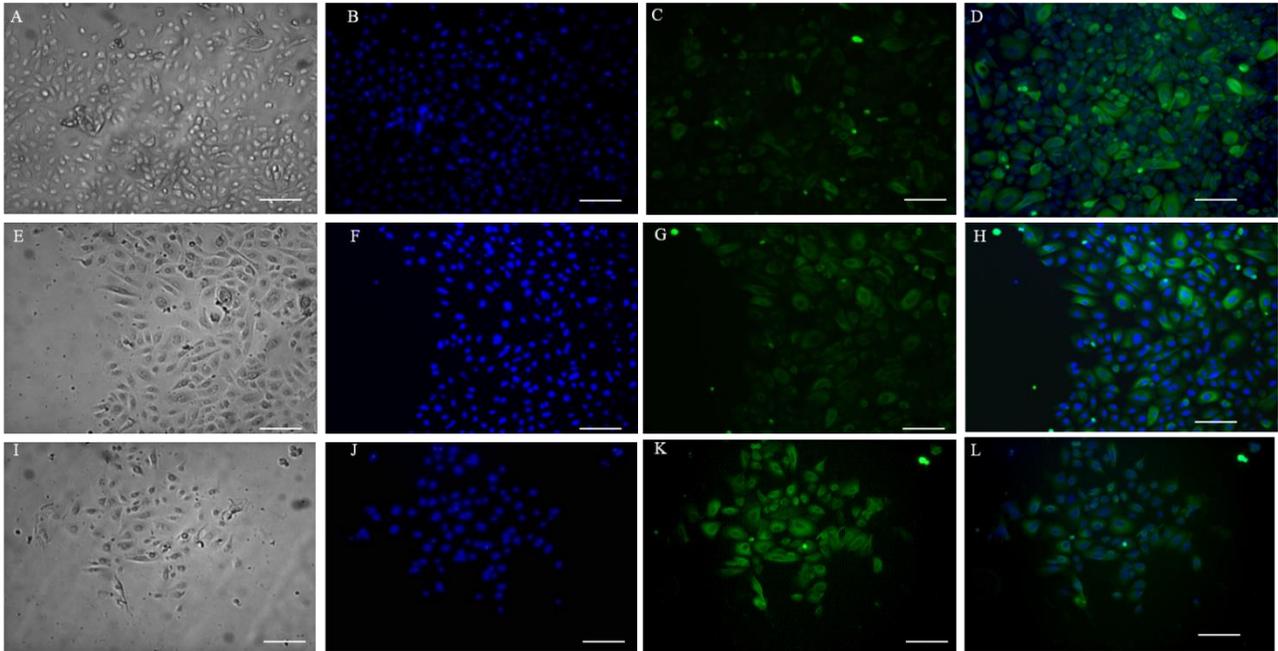
La Figura 21 corresponde a la ausencia de proteína como ME, de forma general existe un aumento en la población celular, además de que las microfotografías nos muestran un cambio en la morfología a las células CK3+, se aprecian células de mayor tamaño (25 a 75 micrómetros de diámetro), que dejaron a un lado el crecimiento aislado, optando por un crecimiento clonal, no obstante existe una mayor expresión de CK3+. Así mismo se logra apreciar a detalle la forma completa de las células epiteliales, se observa el espacio del núcleo celular, esto se corrobora con las microfotografías de la unión (Merge).

En la Figura 22 se muestra el cultivo de células epiteliales en Colágeno IV como ME, de manera general se observa un incremento en la población celular en comparación con los otros intervalos de tiempo, así mismo se muestran la morfología circular de diámetro pequeño de las células epiteliales (CK3+) sin embargo se siguen presentando las células fusiformes que no son positivas al inmuno-marcaje indicado.

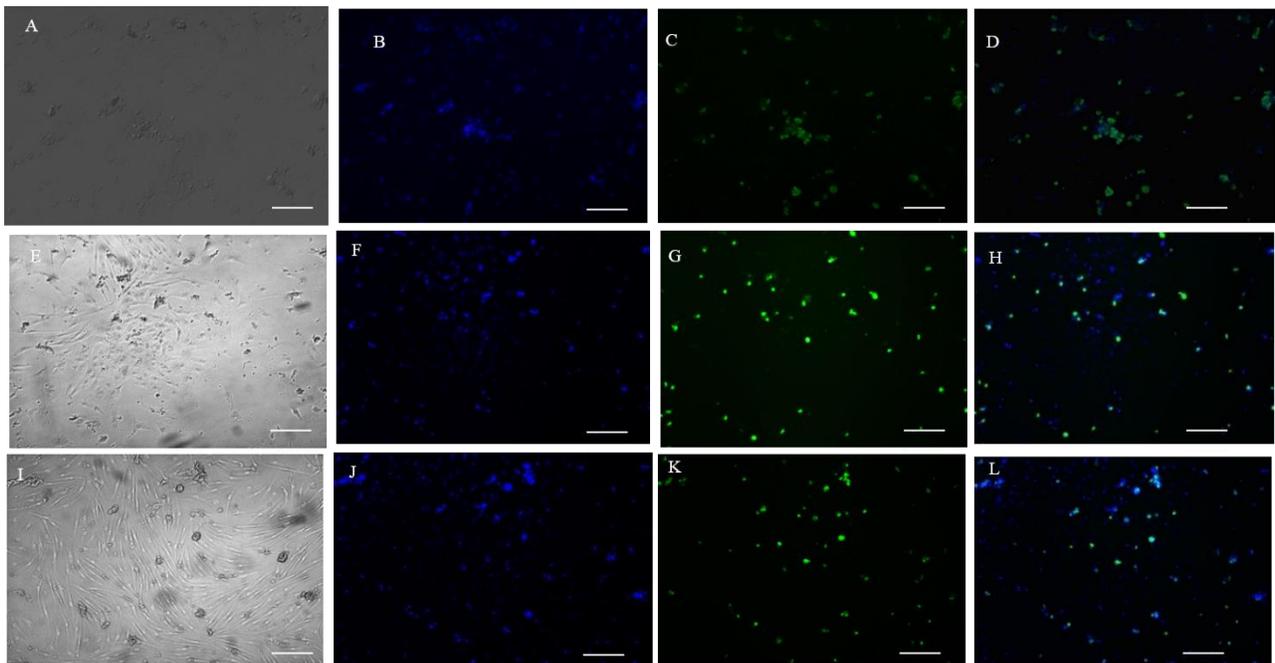
Figura 23, se representa el cultivo de células epiteliales con una ME de Colágeno tipo I, en la cual se visualiza un aumento en la población celular, se percibe el crecimiento no clonal y la morfología del inmuno-fenotipo deseado es circular, el diámetro es de 10 a 20 micrómetros de diámetro.

Figura 24 se exhiben a las células epiteliales con una ME de Fibronectina, en la cual se observa que hubo un aumento en la población CK3+ y se sigue conservando el mismo fenotipo, con respecto del intervalo de tiempo pasado. De manera particular se observa una auto-fluorescencia debida a un posible fragmento de córnea, resultado de la derivación mecánica.

Finalmente en la Figura 25 observamos a las células CK3+ para la ME de Laminina, de manera general no se observa un aumento de la población celular de interés, sin embargo el inmuno-fenotipo es similar al de los intervalos de tiempo anteriores.

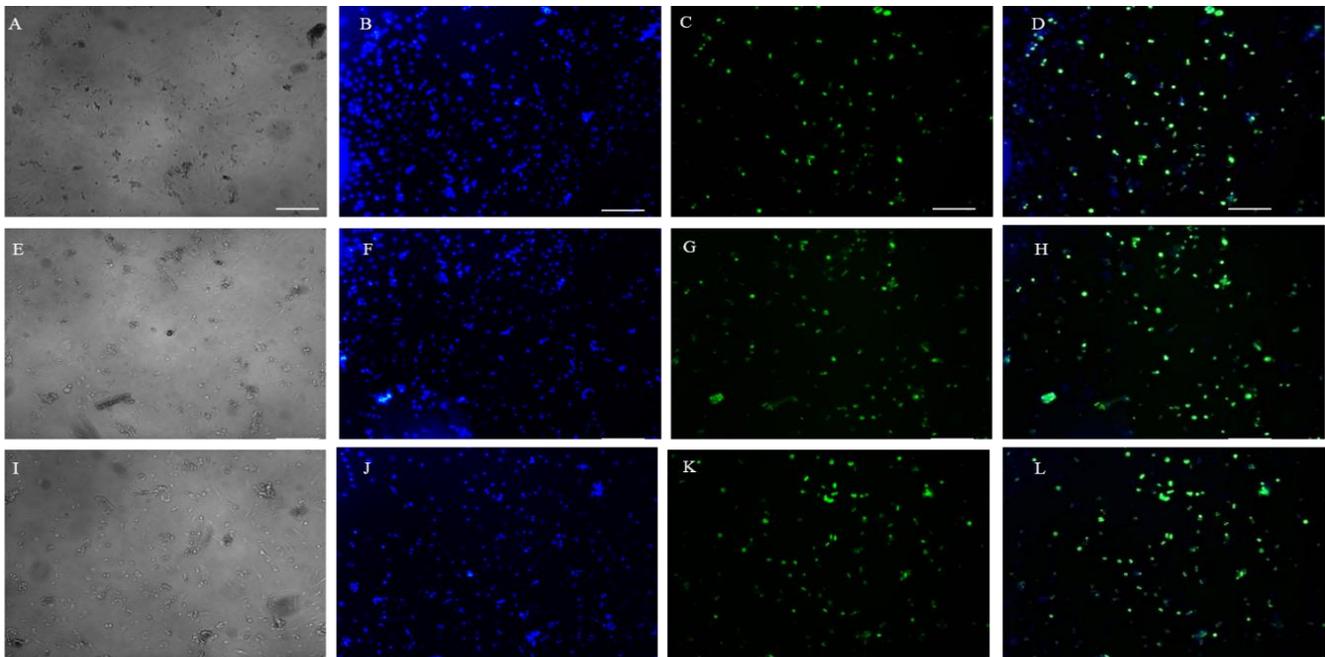


**Figura 21** Microfotografías de inmunocitoquímica de la Ausencia de ME, a 288h (12 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.

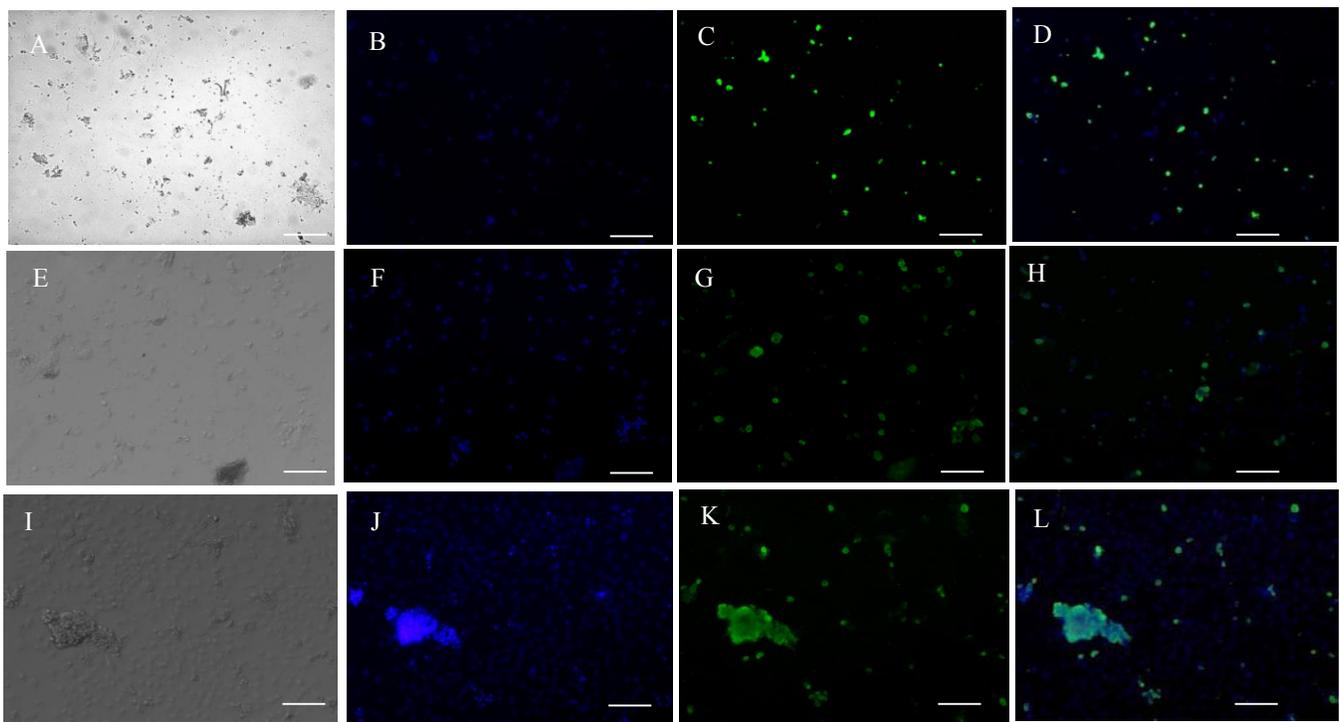


**Figura 22** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo IV como matriz extracelular, a 288h (12 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.

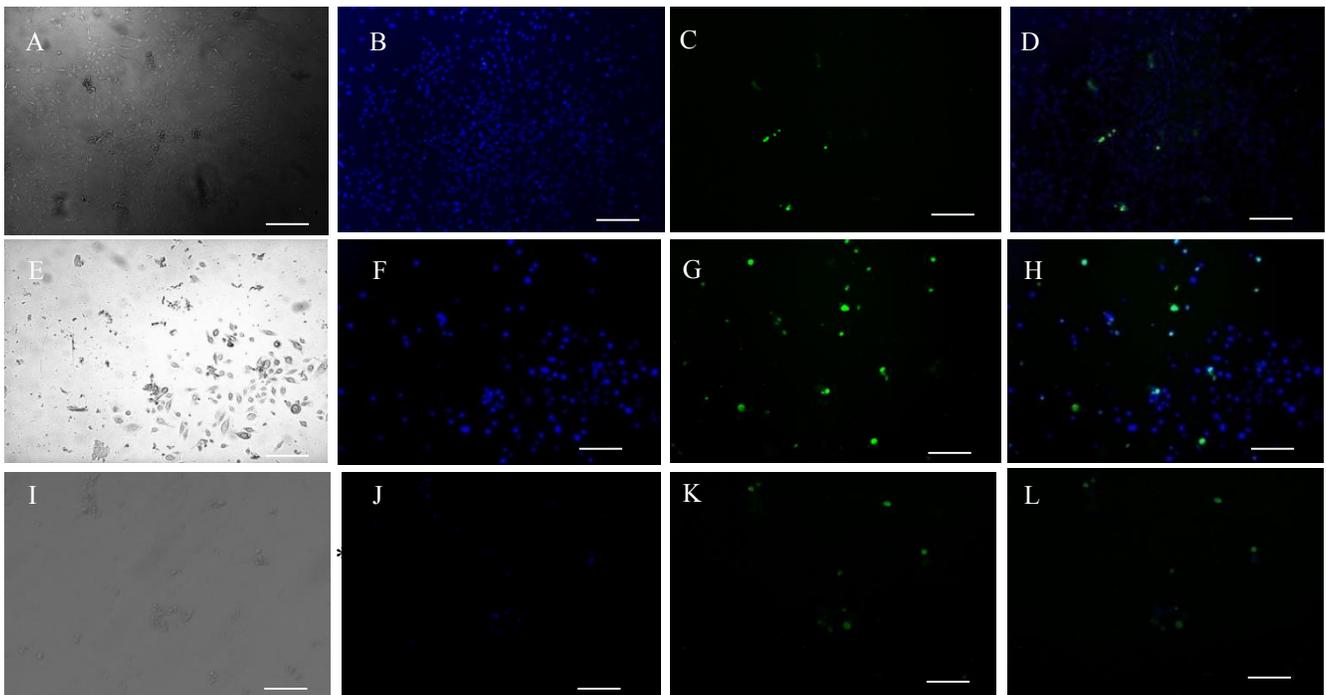
## 10. Discusión



**Figura 23** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I como matriz extracelular, a 288h (12 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.

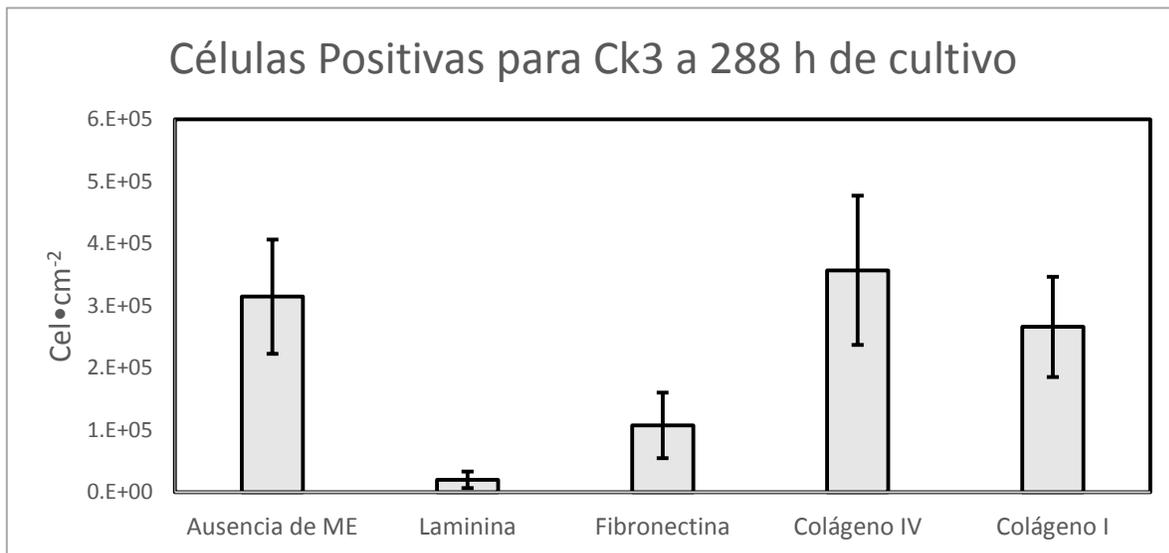


**Figura 24** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina como matriz extracelular, a 288h (12 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X).La escala representa 100µm.



**Figura 2511** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina como matriz extracelular, a 288h (12 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X) .La escala representa 100µm.

En la Figura 26 se muestran los valores promedio de las células epiteliales corneales (CK3+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se observan diferencias significativas si se compara Laminina y Fibronectina contra los colágenos y la ausencia de proteína como ME, estos resultados podrían sugerir una posible expansión selectiva en Colágeno tipo I ( $p=0.004$ ), Colágeno tipo IV ( $p=0.0009$ ) y la ausencia de proteína como ME ( $p=0.032$ ).



**Figura 26.** Células positivas a CK3. Se muestran a las células CK3+ para el tiempo de cultivo de 288h. Se muestra con un asterisco los valores que muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) ( $p=0.032$ ,  $0.0009$ ,  $0.004$ ).

#### 9.4.4 Afinidad de Células Epiteliales Corneales (CK3+) a 360 h de cultivo

En las Figuras 27 – 31. Se muestran las microfotografías de los pozos a 360 h cultivo para cada uno de las unidades experimentales y el control. Se presentan las células positivas para citoqueratina 3 mostrando microfotografías en campo claro, DAPI, CK3+ (en verde) y la unión de la microfotografías con DAPI y CK3+ (merge).

En la Figura 27, se muestran las células CK3+ sin una proteína como ME. De manera general se observa el inmuno-fenotipo circular alargado, que también se observó en el intervalo de tiempo anterior, sin embargo en estas microfotografías se muestran diferentes tamaños del diámetro celular, oscilando de los 20 a los 70 micrómetros. Cabe mencionar que no se presentó la morfología fusiforme. Se vuelve a hacer presente el crecimiento clonal y el aumento en el número de células positivas a CK3.

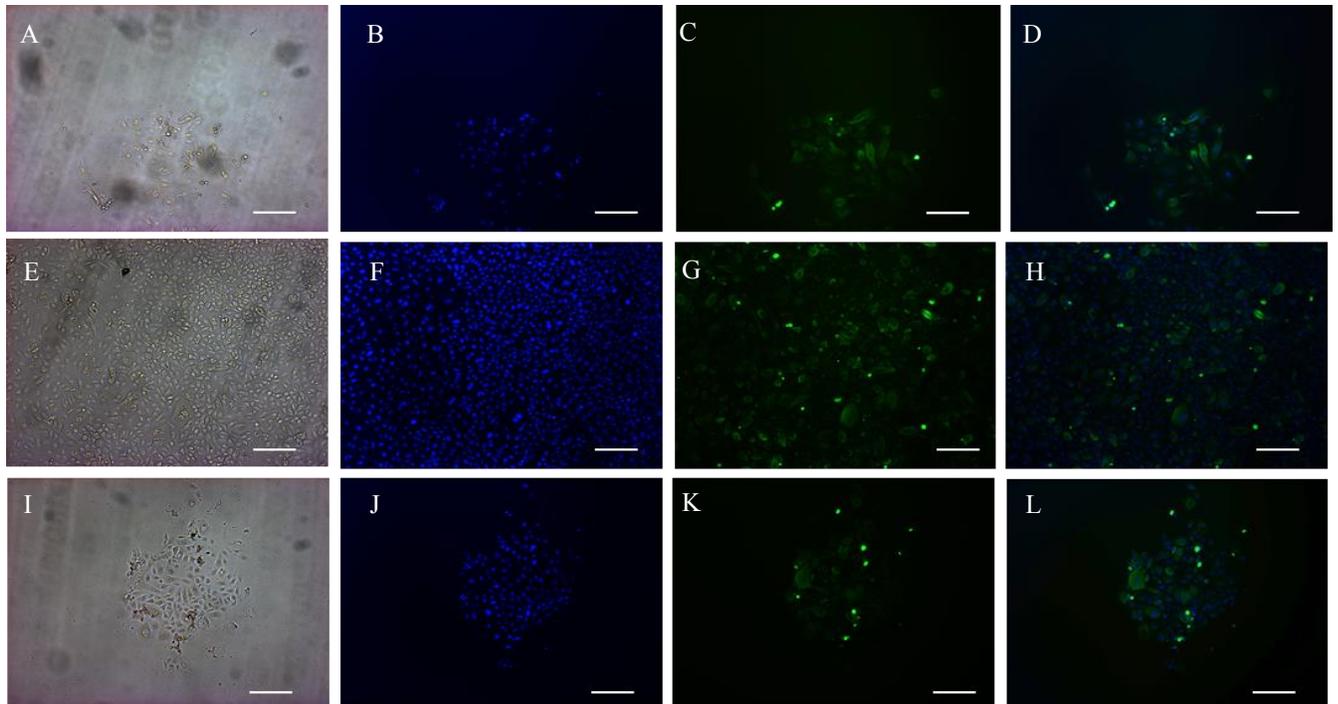
## 10. Discusión

En la Figura 28, se muestra el cultivo sobre Colágeno tipo I como ME, en el cual las microfotografías adquiridas nos reflejan que no existió cambio alguno con respecto a la morfología del inmuno-fenotipo investigado, ya que esta siempre se mantuvo de forma circular y sin crecimiento clonal, se observa la presencia de la morfología fusiforme que no es positiva a CK3. Pero de manera general hay un decaimiento en la población de interés.

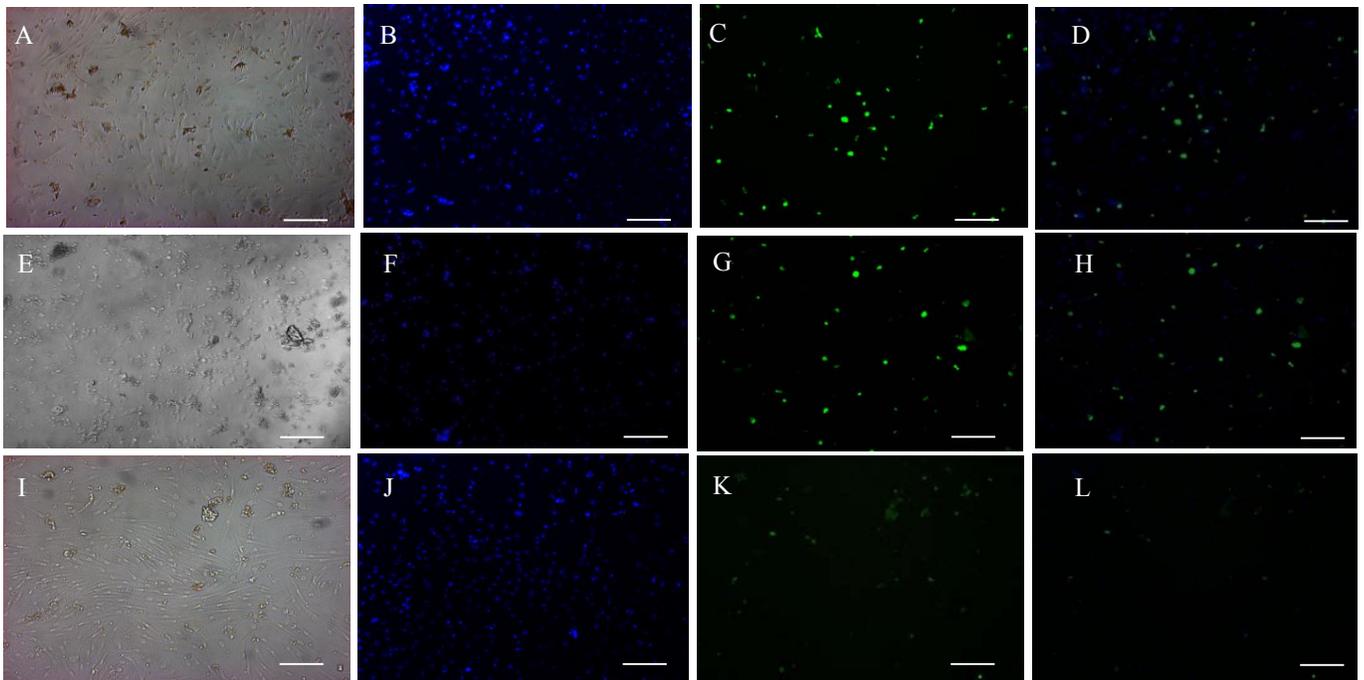
En la Figura 29, se muestran a las células CK3+ sobre Colágeno tipo IV como ME, de manera particular se muestra una morfología similar al intervalo de tiempo anterior, sin embargo se aprecia que la población celular con el inmuno-marcaje buscado se mantuvo en número, de manera particular cabe mencionar que existe una pequeña población de células con la morfología fusiforme (CK3 -).

En la Figura 30, se presentan a las células que crecieron en una ME de Laminina, se evidencia un ligero incremento a la población del inmuno-marcaje deseado, las células presentan una morfología similar al intervalo de tiempo anterior (288h), y el crecimiento sigue sin presentar algún arreglo en particular.

En la Figura 31, se presentan las células cultivadas en Fibronectina como ME. De manera general se presenta una mayor concentración de células positivas a CK3, cabe resaltar que en este intervalo de tiempo se expresan los 2 tipos de morfologías que son positivas al inmuno-marcaje deseado, no obstante ninguna célula excede de los 50  $\mu\text{m}$  de diámetro celular, además de no observar en ninguna microfotografía un crecimiento del tipo clonal.

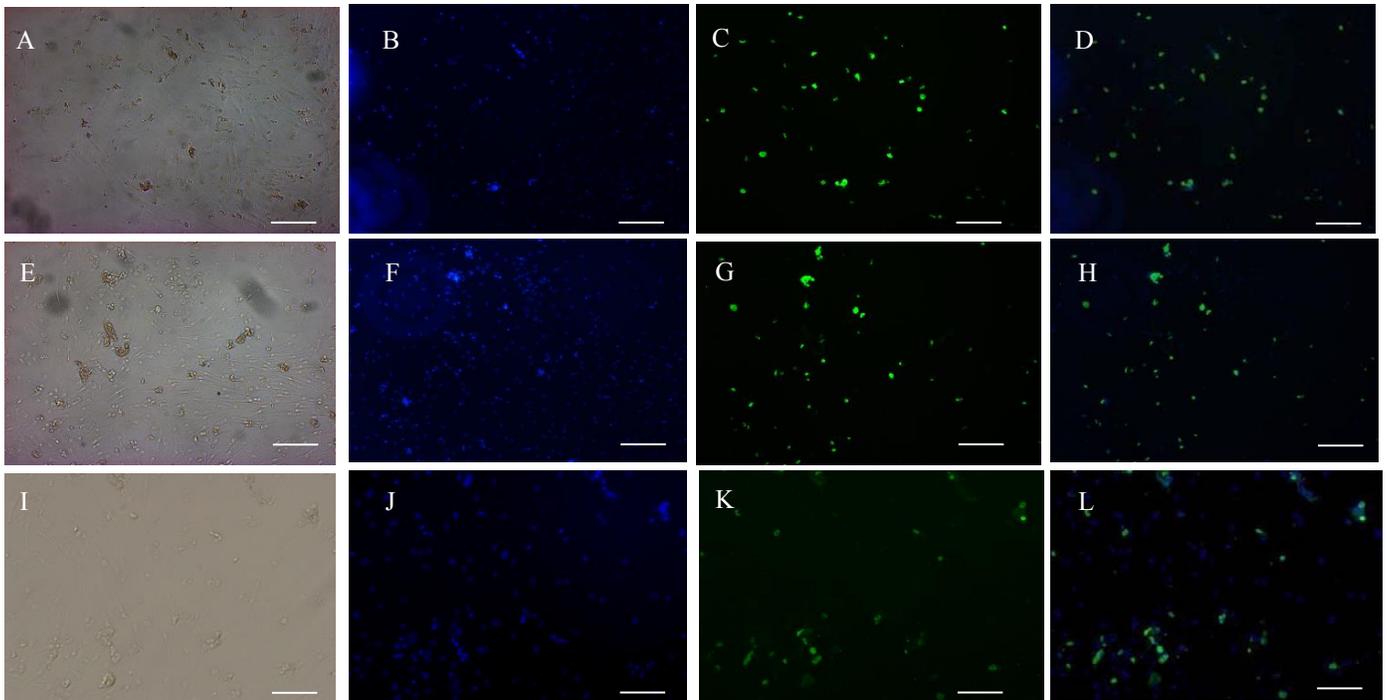


**Figura 27** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de proteína como ME a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm.

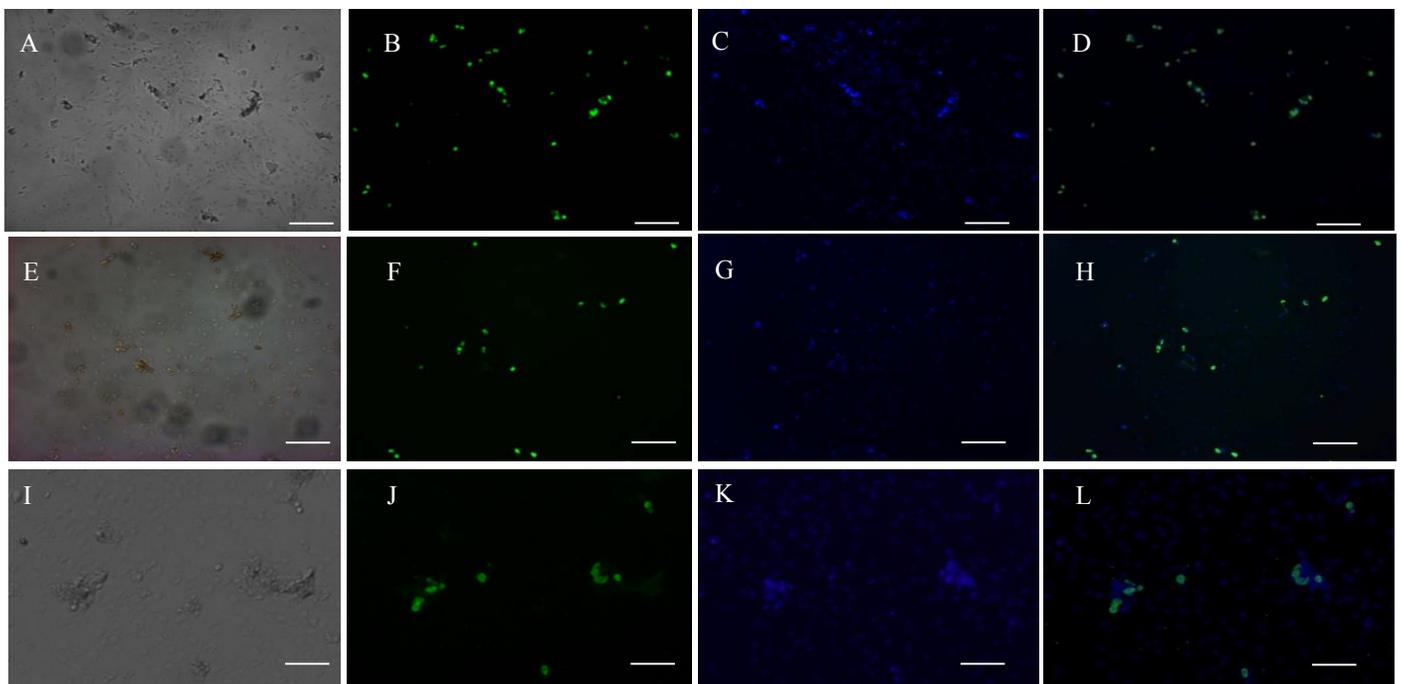


**Figura 28** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I como matriz extracelular, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm.

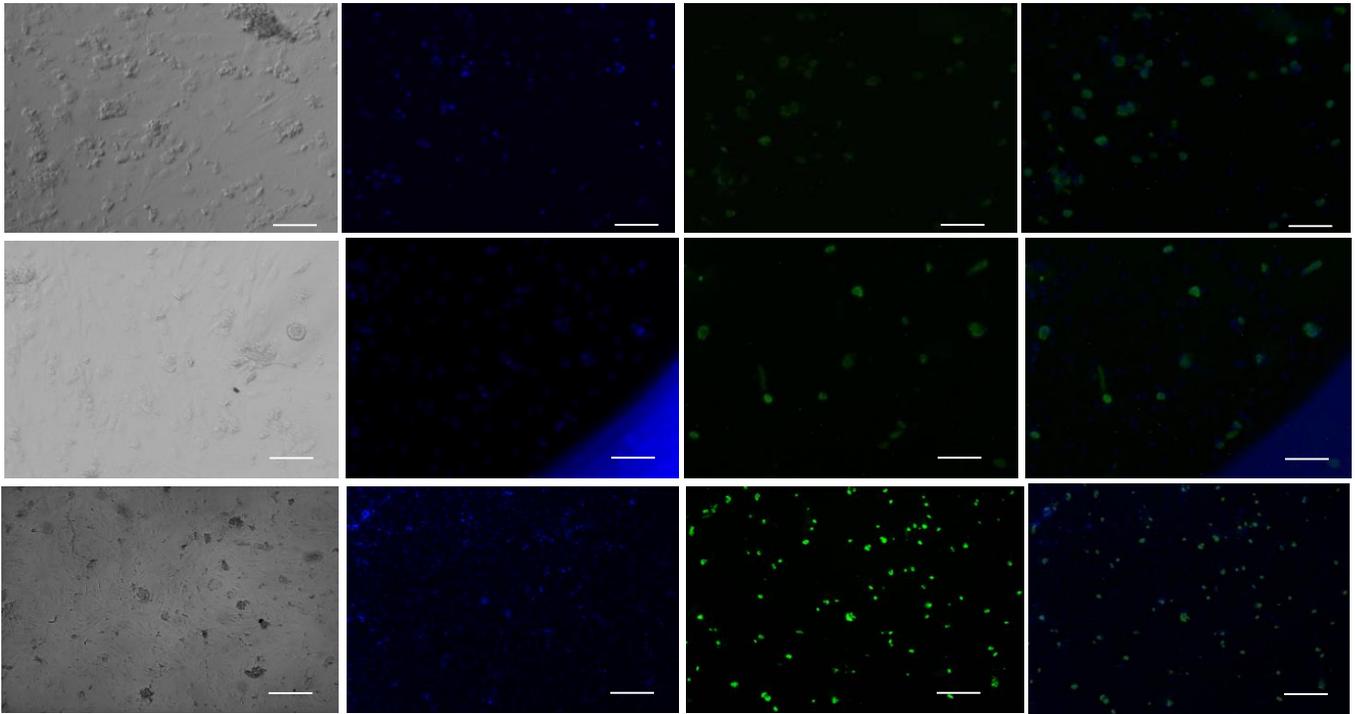
## 10. Discusión



**Figura 29** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo IV como matriz extracelular, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm.



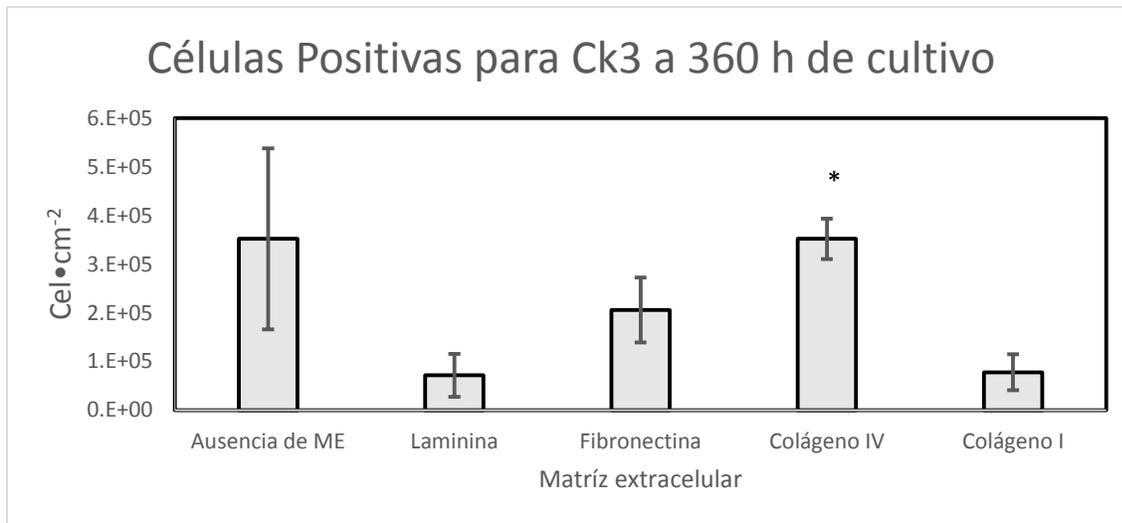
**Figura 30** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina como matriz extracelular, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100µm



**Figura 31** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina como matriz extracelular, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las células positivas para Citoqueratina 3 en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para CK3 en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células CK3+. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

En la Figura 32 se muestran los promedios de las células epiteliales corneales (CK3+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I).

Se observan diferencia significativa comparando las ME de colágeno tipo IV contra Fibronectina ( $p=0.0093$ ,  $\alpha=0.05$ ), por otra lado se observa un decremento de la población celular (CK3+) con colágeno tipo I, estos resultados a este tiempo de cultivo podría sugerir una posible expansión selectiva en Colágeno tipo IV.



**Figura 32** Células CK3+ a 360h de cultivo. Se muestran el total de células positivas a CK3+ por centímetro cuadrado. Se muestra con un asterisco los valores que muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0093$ ).

### 9.5 Afinidad de las Células Troncales Epiteliales Limbales (p63- $\alpha$ +) a diferentes proteínas como matriz extracelular.

Se determinó la afinidad de las CTEL a diferentes proteínas utilizadas como ME. Se documentó esta afinidad a través de microfotografías en los 4 tiempos de evaluación establecidos (7, 9, 12 y 15 días). A continuación se muestran las inmunocitoquímicas para las células troncales epiteliales limbales (p63- $\alpha$ +, marcador específico de las CTEL) para cada uno de los tiempos de cultivo con sus respectivas proteínas (Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV y Colágeno tipo I) y la ausencia ME. Con la finalidad de revelar su morfología fue necesario tomar microfotografías en campo claro, DAPI, p63- $\alpha$  (en verde, correspondiente a anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 488) y la unión de la microfotografías con DAPI y p63- $\alpha$  (merge). Hay que resaltar que p63 es un factor de transcripción que se expresa en el núcleo; y en la foto de unión se logra apreciar el núcleo teñido de ambos colores (Verde y Azul). En total se adquirieron 9 microfotografías que representaran al pozo de cultivo; por fines de espacio, se muestran tres microfotografías para cada proteína y para la ausencia de proteína.

### 9.5.1 Afinidad de CTEL (p63- $\alpha$ +) a 168 h de cultivo.

En las Figuras 33 – 37 en donde se muestran las microfotografías correspondientes a 168h de cultivo para cada uno de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME.

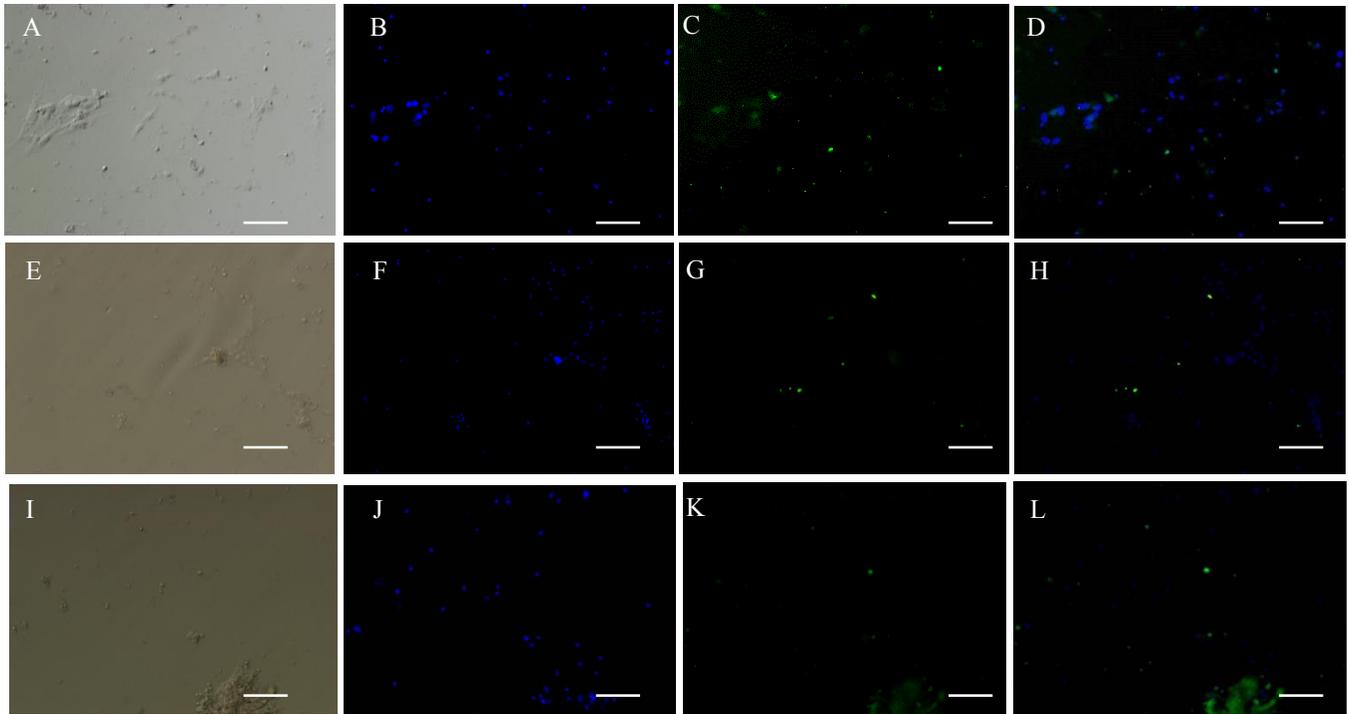
En la Figura 33, se muestra el cultivo celular sin proteína como ME, se distingue una pequeña población positiva a p63- $\alpha$ +, su morfología es un poco confusa, debido a que la co-localización no corresponde en todos los casos, de manera general la morfología se representa de manera circular y con un núcleo mayor al 50% de la célula.

En la Figura 34, se muestran a las células positivas para p63- $\alpha$ +, sobre una ME de Colágeno tipo IV, mostrando una pequeña población agrupada en colonias de células positivas para el inmuno-marcaje deseado, la morfología que es positiva a p63- $\alpha$ + es de forma circular y un núcleo mayor al 50% de la célula.

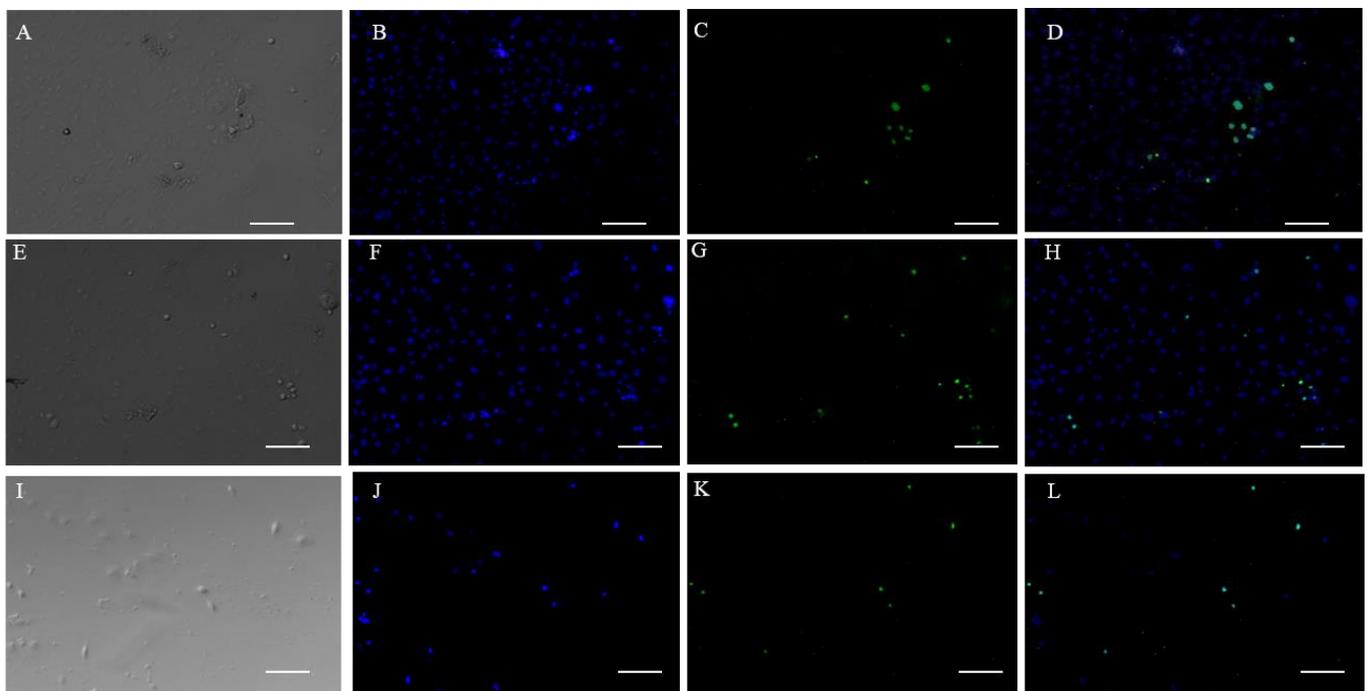
En la Figura 35, se muestra el cultivo celular sobre Colágeno tipo I, de manera particular se observa poca presencia de células positivas para p63- $\alpha$ +, la morfología de las células positivas al inmuno-marcador son células menores a 30  $\mu$ m, circulares y con un núcleo de un tamaño considerable.

En la Figura 36, se observa al cultivo celular sobre una ME de Fibronectina, en el cual observamos un crecimiento poco confluyente, con un número pequeño de células positivas al inmuno-fenotipo buscado, conservando la morfología circular, con un gran núcleo (mayor al 50% total de la célula) y menor a 30  $\mu$ m.

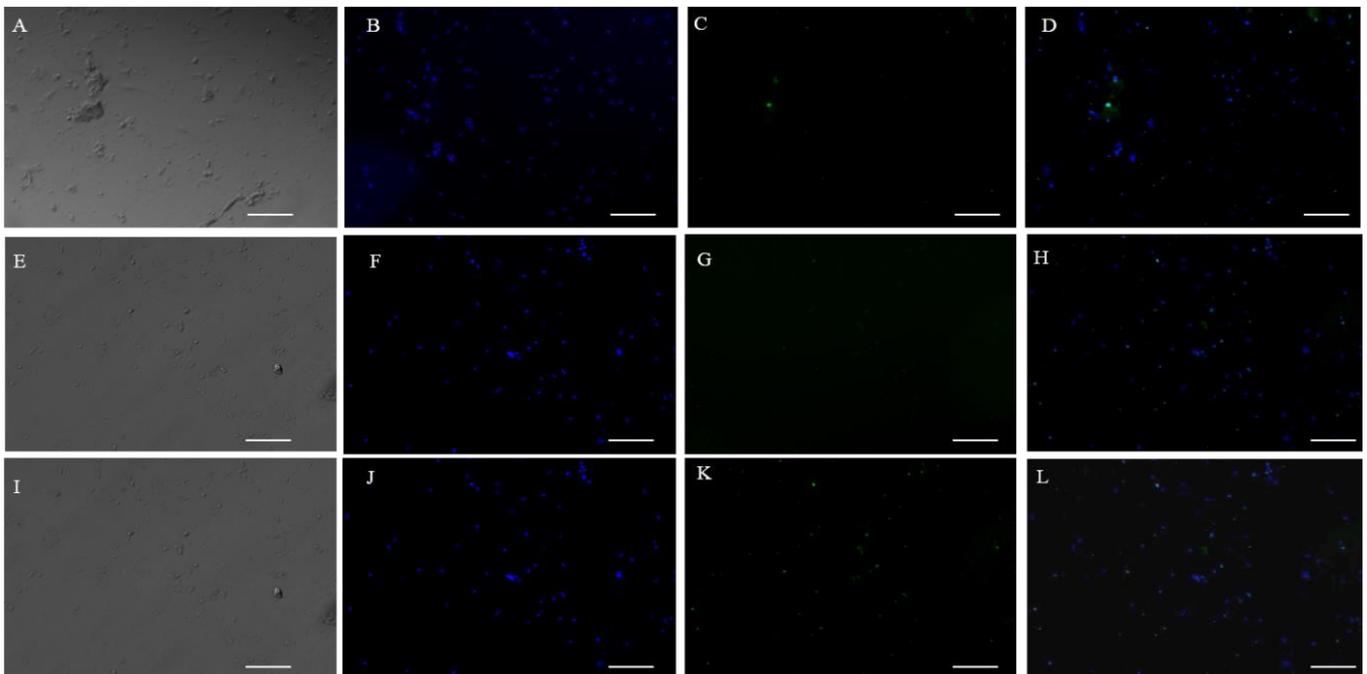
En la Figura 37, se observa el cultivo celular sobre una ME de Laminina, en donde claramente se muestra que hay una menor cantidad de células positivas al inmuno-fenotipo buscado (en comparación con las otras ME), además de no alcanzar a percibir una morfología en particular.



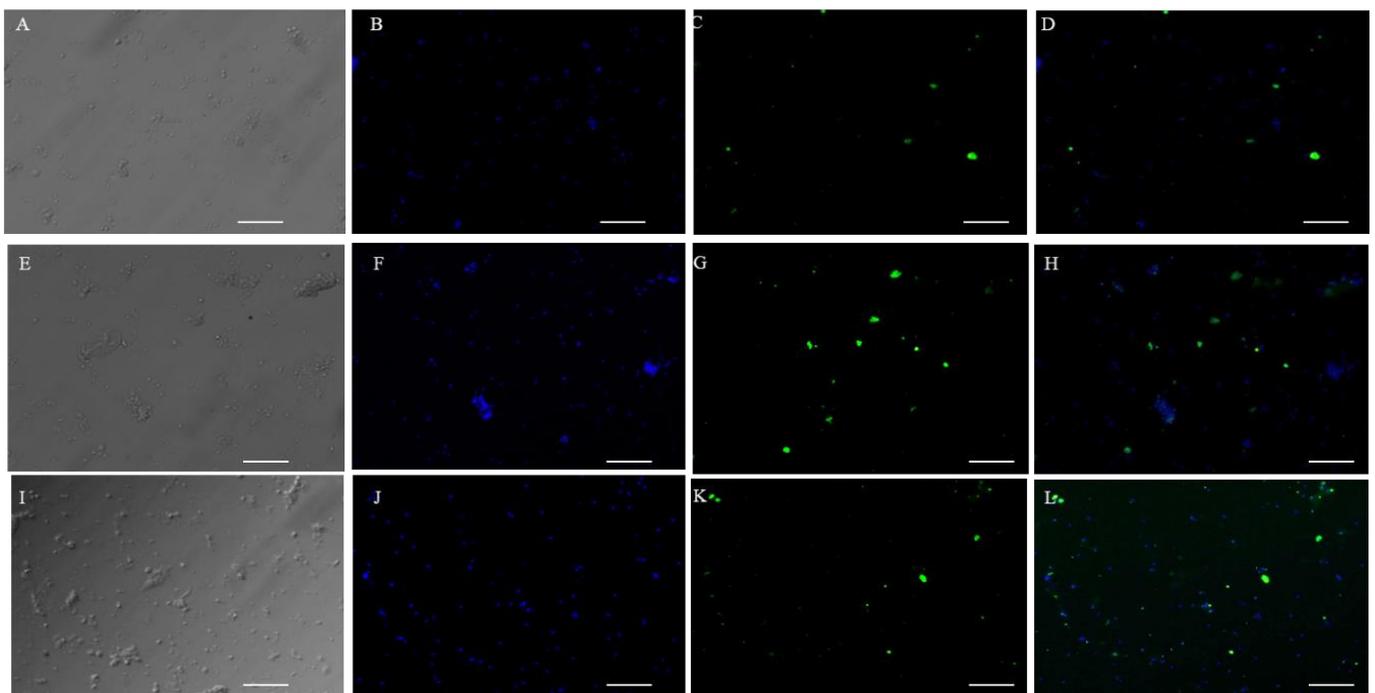
**Figura 33** 12 Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME, a 168h (7 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ + . (10X) . La escala representa 100 $\mu$ m.



**Figura 34** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo IV, a 168h (7 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ + . (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

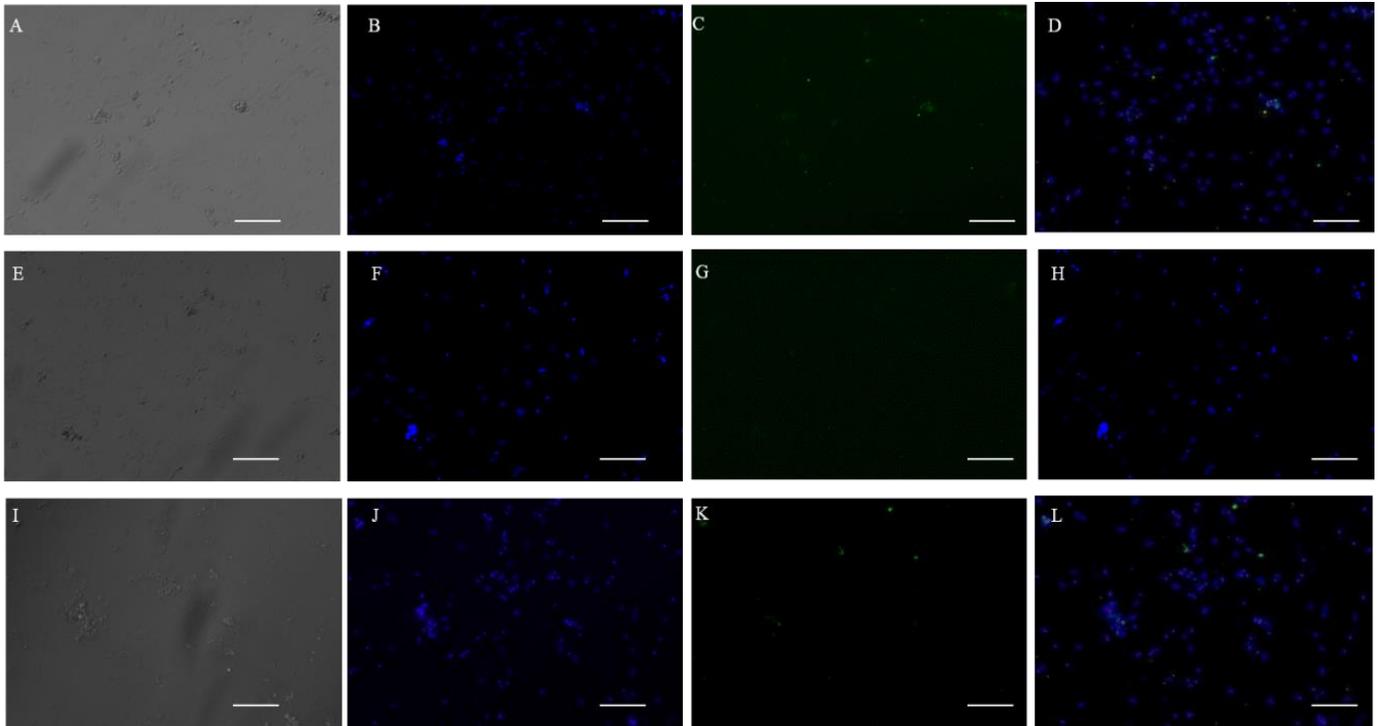


**Figura 35** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I, a 168h (7 días) de cultivo. Se muestran a las CTEL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.



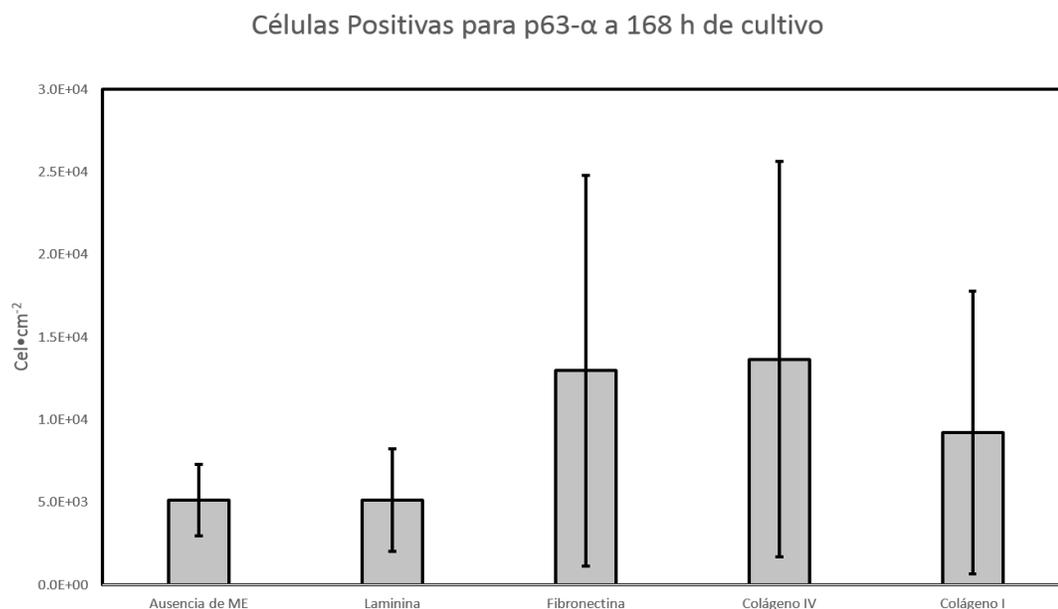
**Figura 36** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina, a 168h (7 días) de cultivo. Se muestran a las CTEL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

## 10. Discusión



**Figura 37** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina, a 168h (7 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

En la Figura 38 se muestran los promedios de las CTCL (p63- $\alpha$ +) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se revela que el promedio celular de CTCL a 168h de cultivo es de 5,000 células por  $\text{cm}^2$ , además de no existir diferencias significativas entre las ME.



**Figura 38.** Se muestran las células p63- $\alpha$ + por centímetro cuadrado a 168h (7 días) de cultivo. No existen diferencias significativas entre Colágeno tipo I contra todas las demás unidades experimentales ( $\alpha=0.05$ ).

### 9.5.2 Afinidad de CTCL (p63- $\alpha$ +) a 216 h de cultivo.

En las Figuras 39 – 43, se muestran las microfotografías correspondientes a 216h cultivo para cada una de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME.

En la Figura 39, se muestran a las células positivas para p63- $\alpha$  que crecieron sin proteína como ME, en comparación con el intervalo de tiempo anterior y a las demás muestras en las diferentes ME existe un aumento en la población considerable, además de revelar una expansión de tipo clonal, cabe resaltar que en las microfotografías del merge (unión) se observa co-expresión superior al 60% de células positivas al inmuno-fenotipo deseado.

En la Figura 40, se muestran el cultivo de CTCL correspondiente a Colágeno tipo IV como ME, se observa un aumento en la población celular p63- $\alpha$ +, además de mostrarse clonas muy bien definidas, así mismo la morfología es similar al intervalo de tiempo anterior.

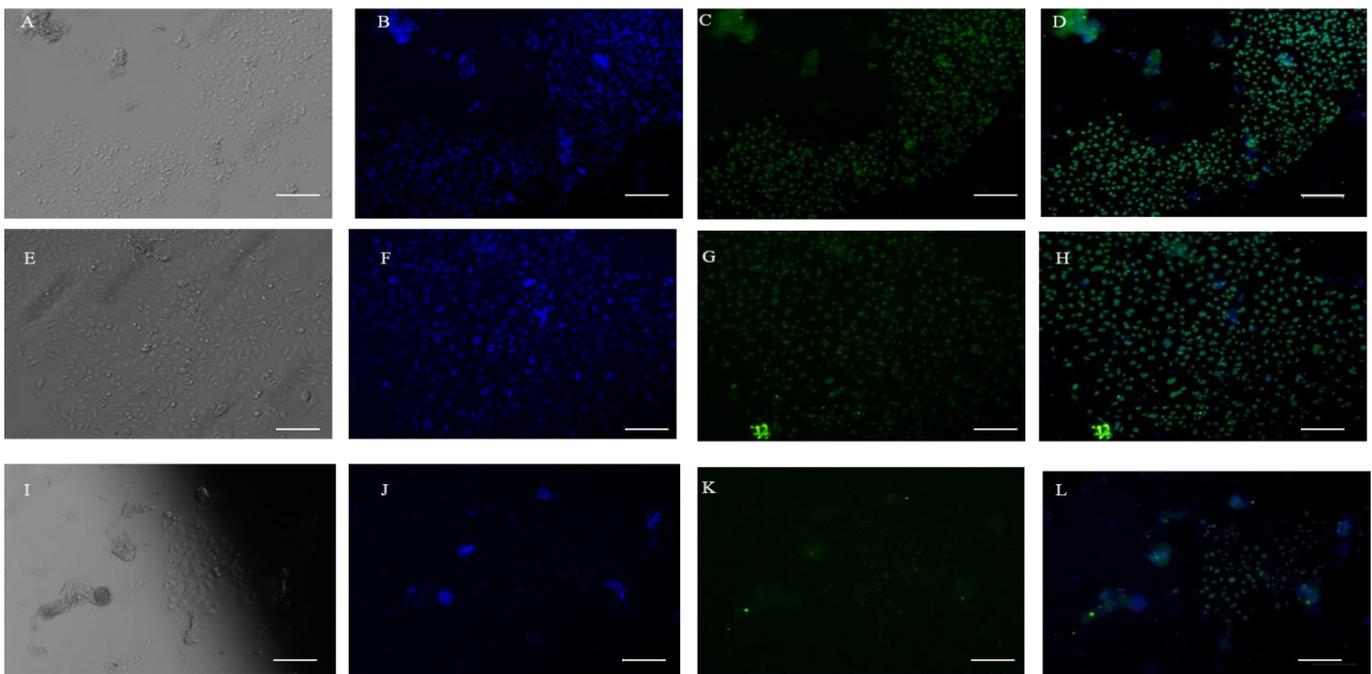
En la Figura 41, se revelan las microfotografías correspondientes al Colágeno tipo

## 10. Discusión

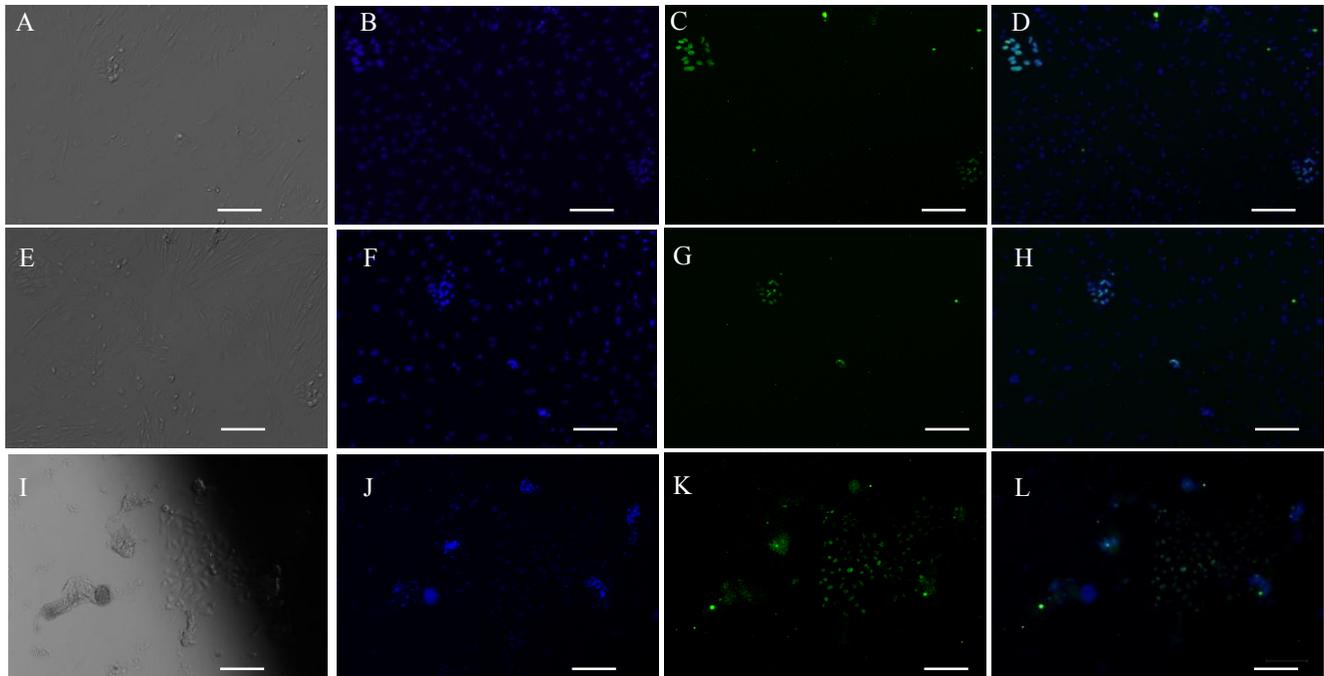
Como ME, comprobando un crecimiento en la población de células p63- $\alpha$ +, se revela su crecimiento en clonas muy bien definidas, además se corrobora la morfología antes descrita (células circulares, menores a los 30 $\mu$ m y con un núcleo mayor al 50% del total de la célula).

En la Figura 42, se muestran los cultivos sobre Fibronectina como ME, en donde existe poco crecimiento por parte de las CTCL (p63- $\alpha$ +), así mismo no se muestra un crecimiento en particular y la morfología celular sigue con las características antes ya mencionadas.

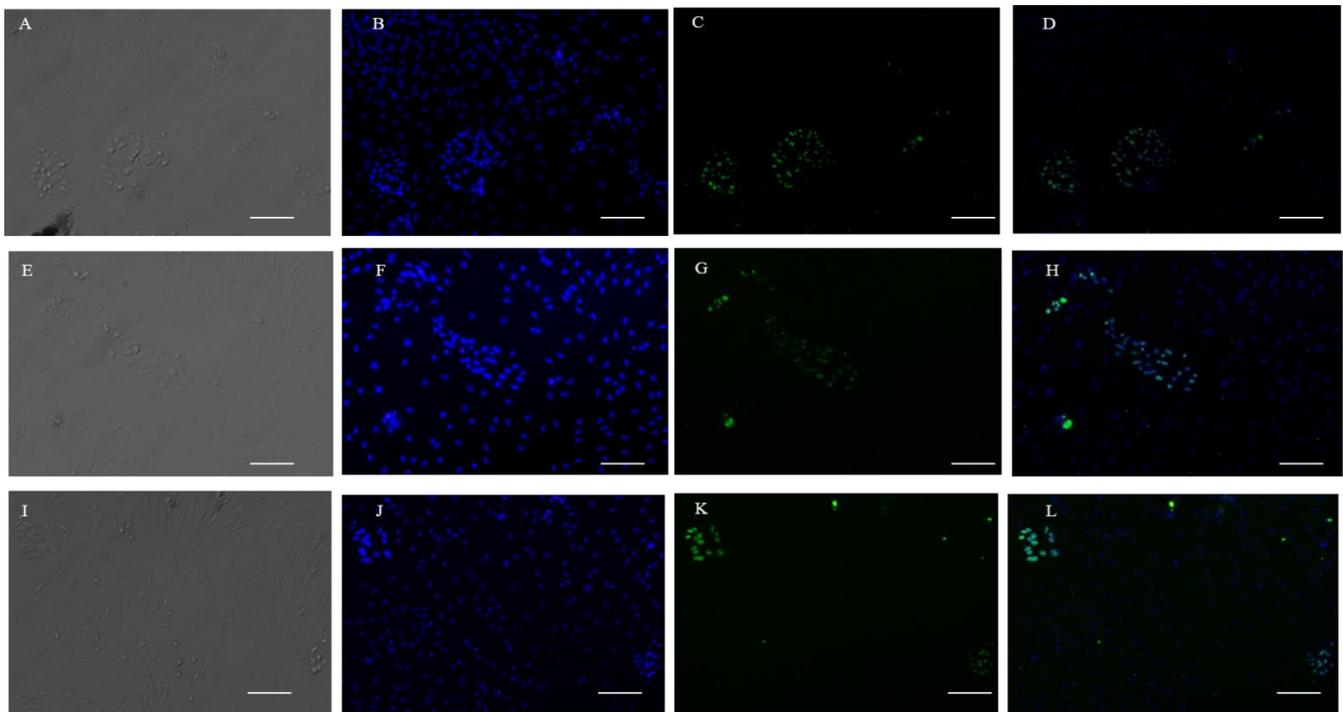
En la Figura 43, se muestra el cultivo celular sobre Laminina como ME, exhibiendo el nulo crecimiento por parte del inmuno-fenotipo deseado (p63- $\alpha$ +).



**Figura 3915** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) .La escala representa 100 $\mu$ m.

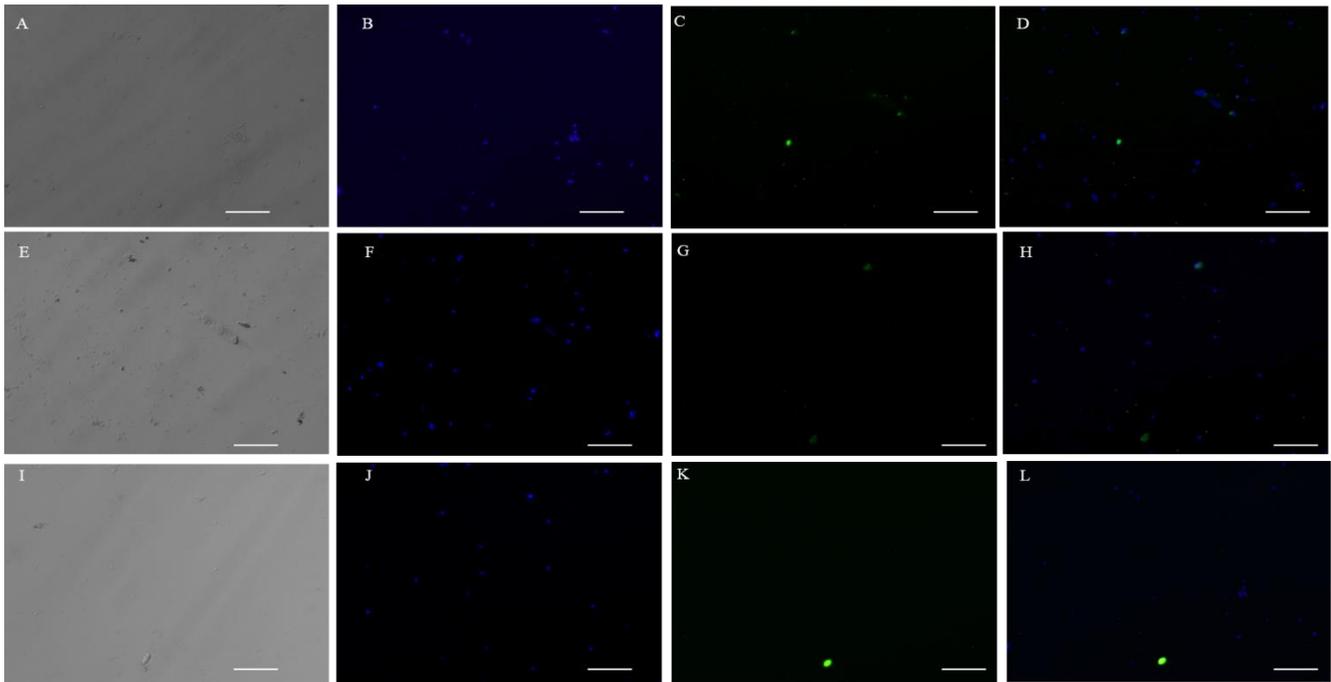


**Figura 40.** Microfotografías de Colágeno tipo IV, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

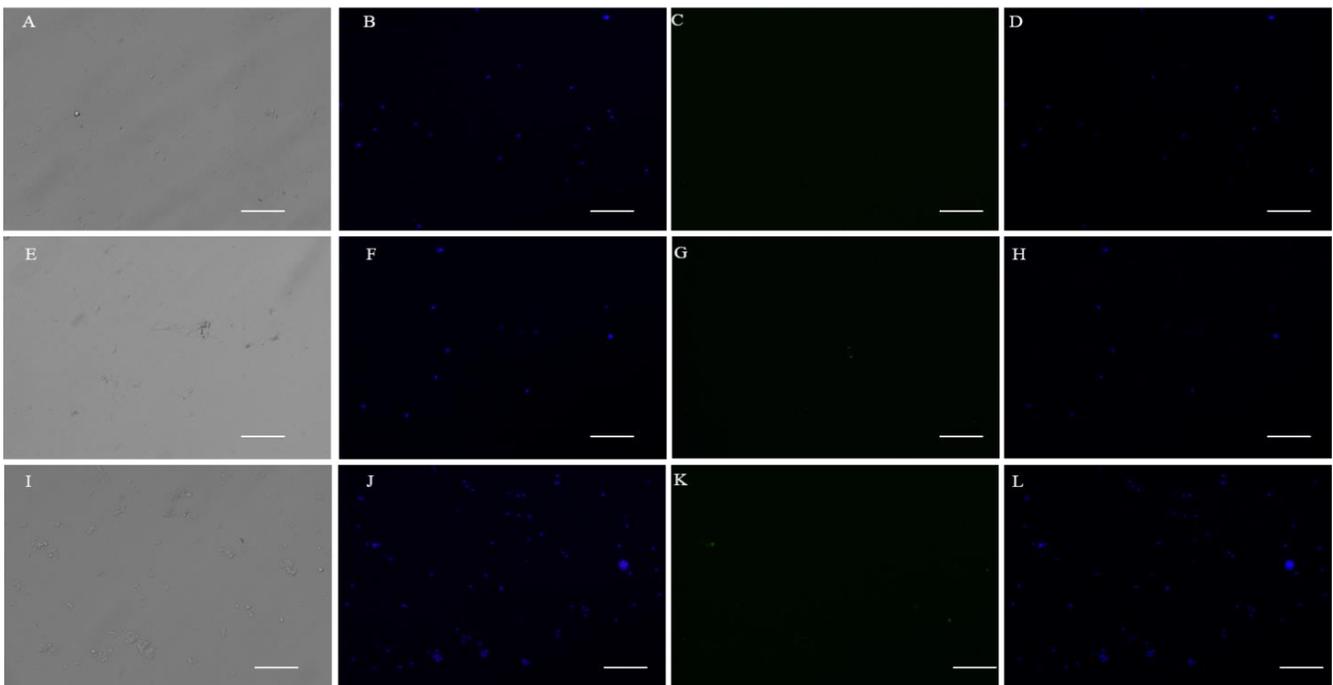


**Figura 41.** Microfotografías de Colágeno tipo I, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m.

## 10. Discusión

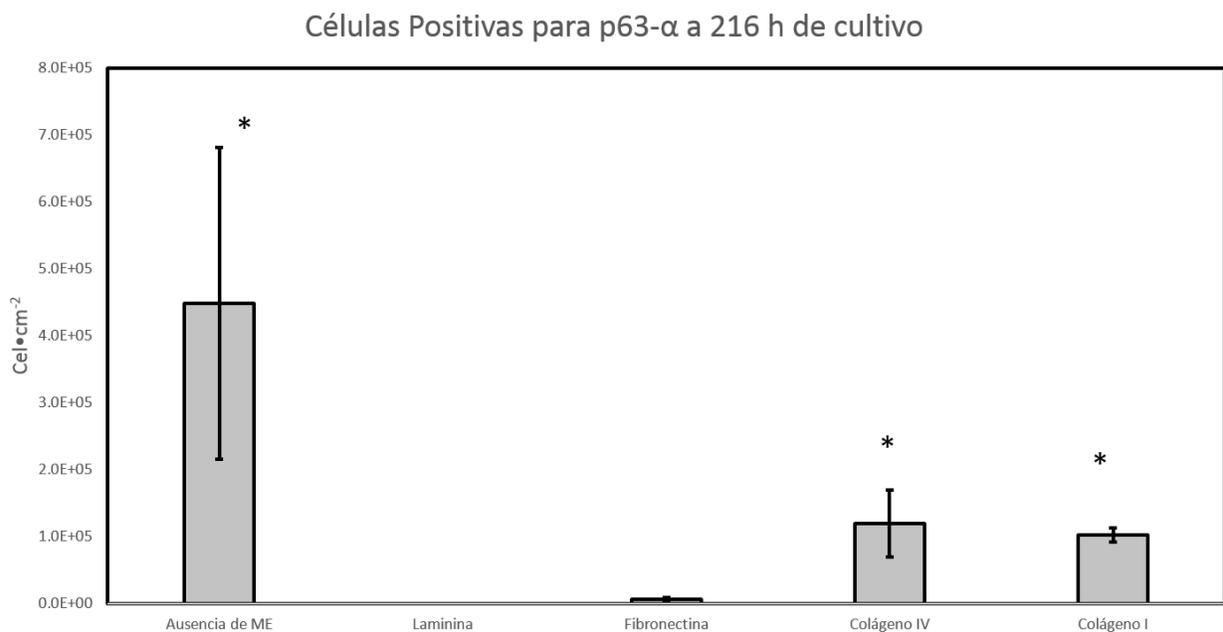


**Figura 42** Microfotografías de Fibronectina, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m



**Figura 43**16. Microfotografías de Laminina, a 216h (9 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X). La escala representa 100 $\mu$ m

En la Figura 43 se muestran los promedios de las CTCL (p63+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se observa que la ausencia de ME posee una mayor cantidad de cel/cm<sup>2</sup>, existiendo diferencias significativas entre ausencia de ME contra Fibronectina, y Laminina. ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.035$   $p=0.043$ ).



**Figura 44.** Se muestran las células p63- $\alpha$ + por centímetro cuadrado a 216h (9 días) de cultivo. El asterisco (\*) indica la existencia de diferencias significativas entre Colágeno tipo I contra todas las demás unidades experimentales ( $\alpha=0.05$ ).

### 9.5.3 Afinidad de CTEL (p63- $\alpha$ +) a 288 h de cultivo.

En las Figuras 44 – 48, se muestran las microfotografías correspondientes a 288h cultivo para cada una de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME.

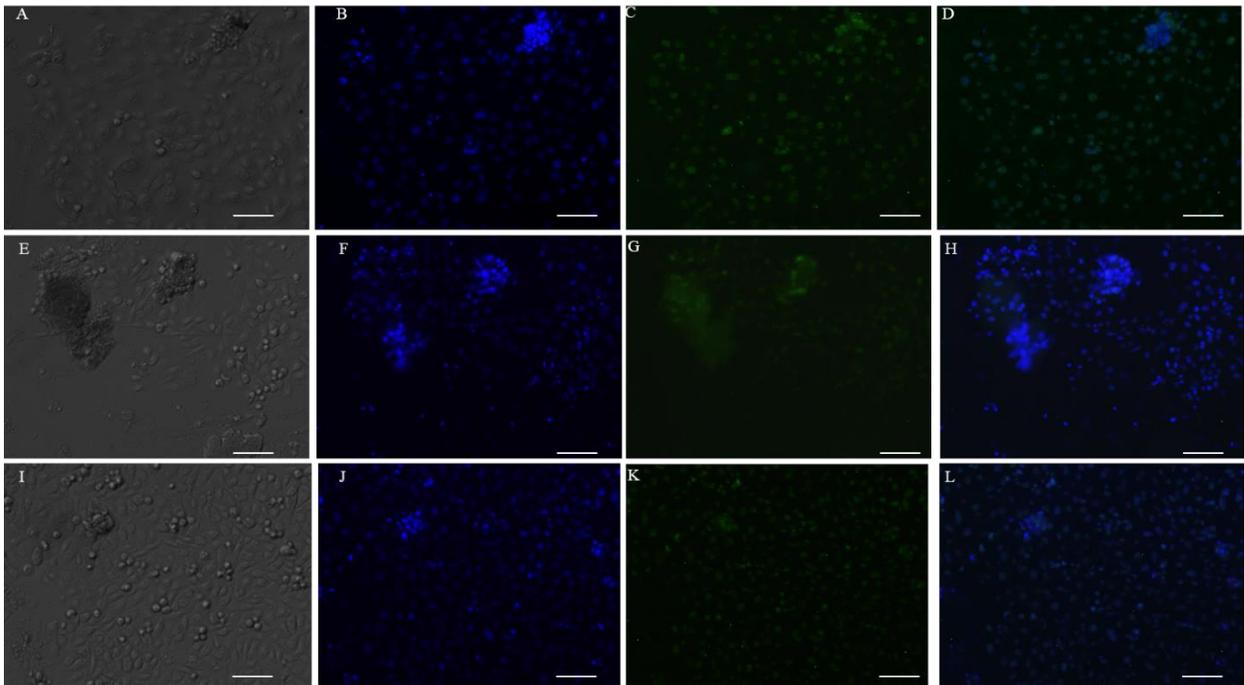
En la Figura 44, se observa el cultivo de CTEL sin proteína base como ME, en la cual revela que no hubo un crecimiento en el inmuno-fenotipo deseado, no hay cambios en la morfología celular, sin embargo las clonas tiene un tamaño mayor al de 400 $\mu$ m de longitud y una pureza el 60%.

En la Figura 45, se revelan las microfotografías de CTEL cultivadas en Colágeno tipo I, observando un claro aumento en la población, subsecuentemente hay un aumento en las CTEL, esto se ve reflejado en el número de células positivas para el inmuno-fenotipo p63- $\alpha$ + (siendo este intervalo el más alto de todo el experimento); la pureza en este intervalo es del 90%, las clonas son mayores a 500 $\mu$ m de longitud y no existen cambios en la morfología.

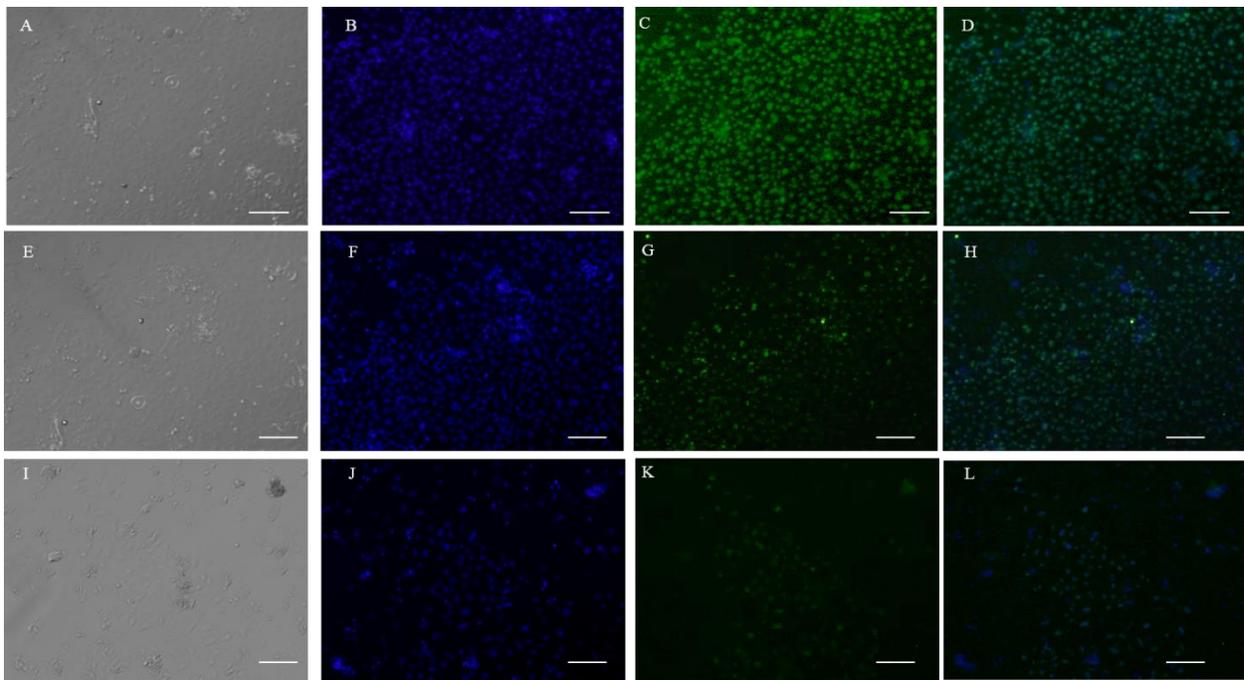
En la Figura 46, se revelan las imágenes adquiridas para el cultivo celular en Colágeno tipo IV como ME, en donde se muestra un incremento en la población celular de CTEL en comparación con el intervalo de tiempo anterior, igualmente existe la morfología común de las CTEL que se ha presentado durante todo el experimento.

En la Figura 47, se observa las microfotografías adquiridas para la ME de Fibronectina, en donde existe una pequeña población de CTEL, sin embargo se nota la presencia de una morfología fusiforme (antes descrita en los cultivos células epiteliales corneales).

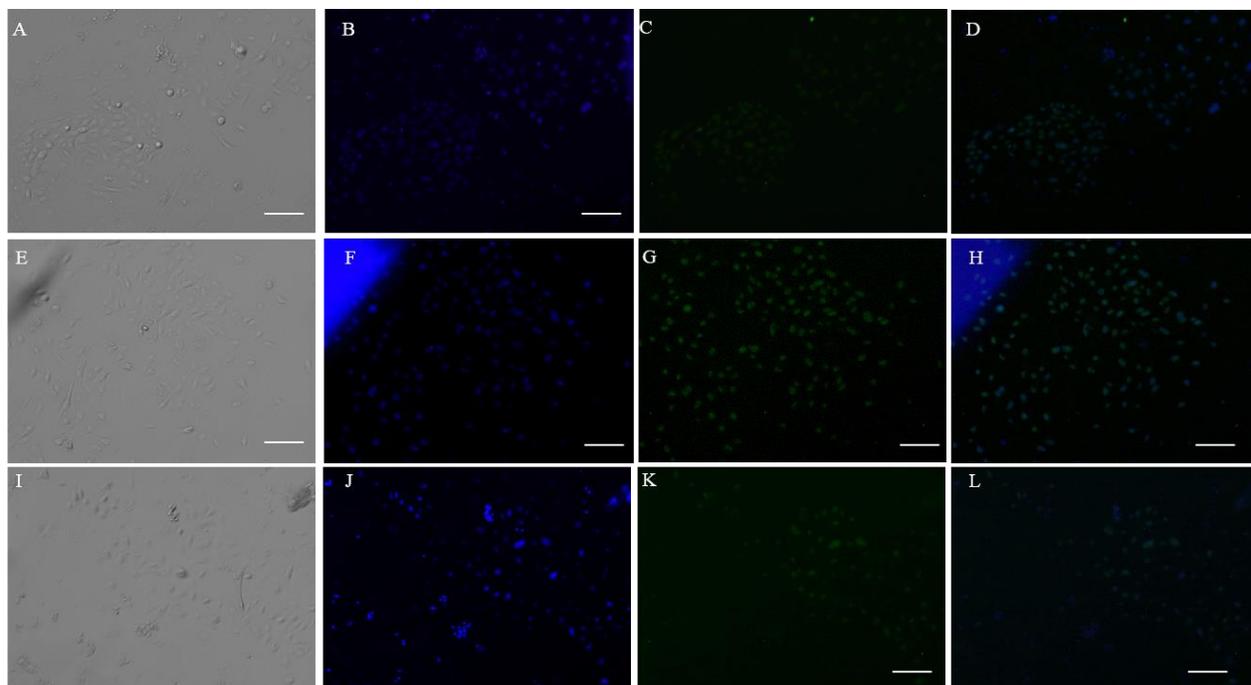
En la Figura 48, las microfotografías corresponden al cultivo con Laminina como ME. Se observa un nulo crecimiento del inmuno-fenotipo buscado, además de presentar células de forma fusiforme, tal y como se mostró en los cultivos de células epiteliales corneales (CK3+).



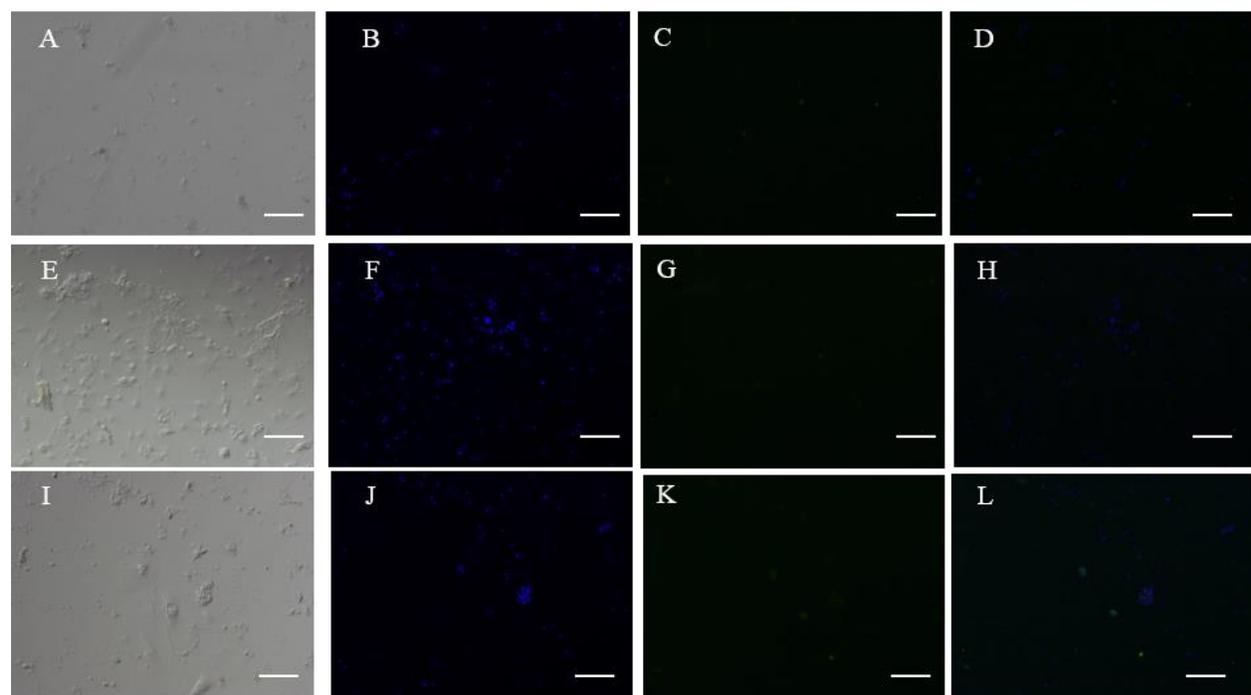
**Figura 44** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME, a 288h (12días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) . La escala representa 100 $\mu$ m.



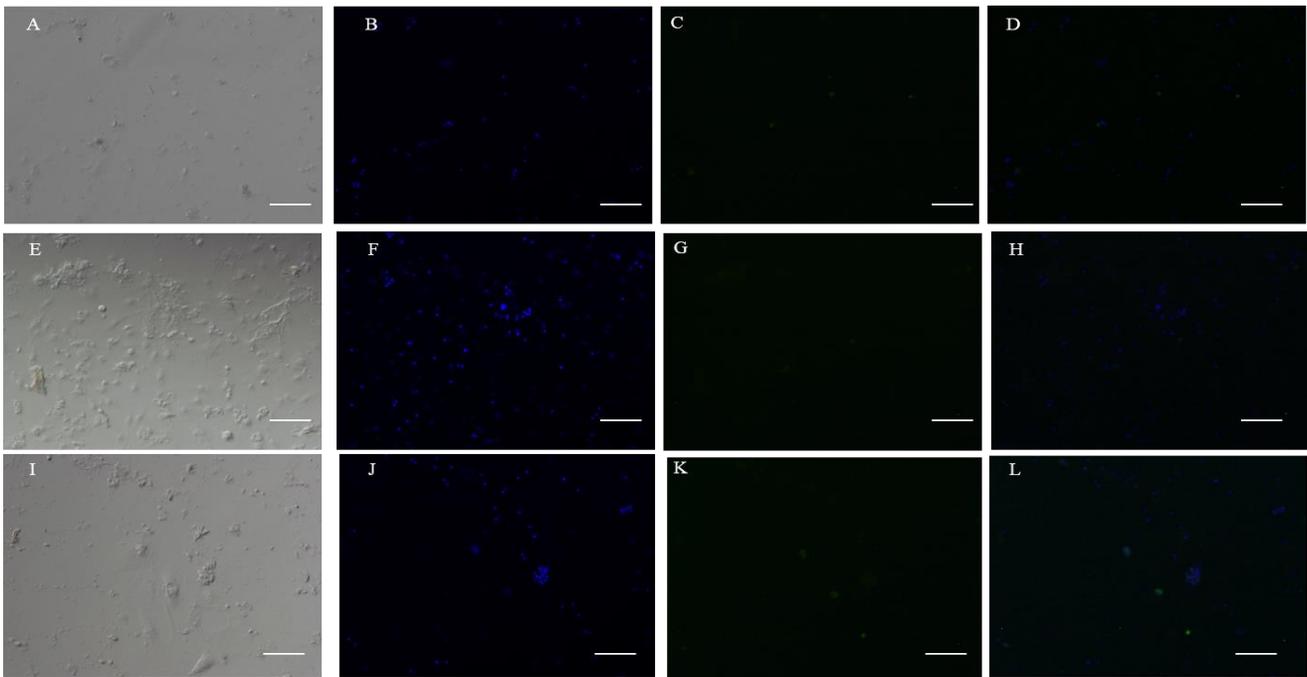
**Figura 45** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I, a 288h (12días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) la escala representa 100 $\mu$ m.



**Figura 46** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo IV, a 288h (12días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) .La escala representa 100  $\mu$ m.

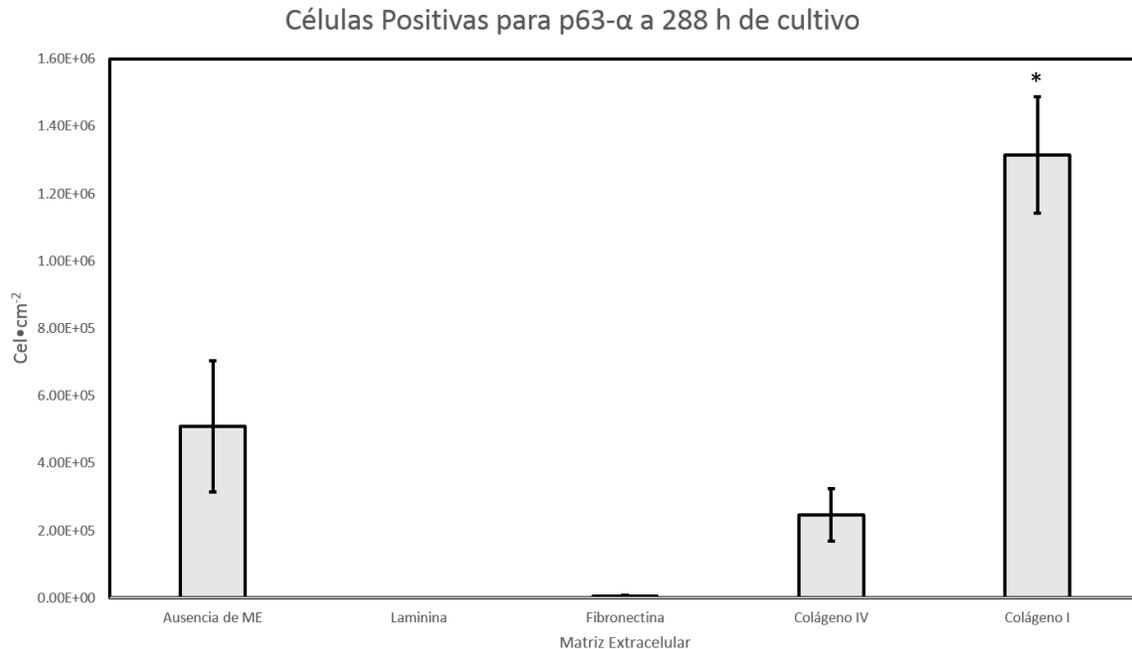


**Figura 47** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina, a 288h (12días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) .La escala representa 100 $\mu$ m.



**Figura 48** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina, a 288h (12días) de cultivo. Se muestran a las CTEL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) la escala representa 100 $\mu$ m.

En la Figura 49 se muestran los promedios de las CTEL (p63+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se muestra un incremento considerable en las poblaciones p63- $\alpha$ +. De manera particular en Colágeno tipo I hay un incremento de más de 900,000 cel/cm<sup>2</sup>, existen diferencias significativas entre la matriz de colágeno tipo I contra las demás unidades experimentales ( $p=0.00036$ ,  $\alpha=0.05$ ).



**Figura 49.** Se muestran las células p63- $\alpha$ + por centímetro cuadrado a 288h (12 días) de cultivo. El asterisco (\*) indica la existencia de diferencias significativas entre Colágeno tipo I contra todas las demás unidades experimentales ( $p=0.00036$ ,  $\alpha=0.05$ ).

#### 9.5.4 Afinidad de CTEL (p63- $\alpha$ +) a 360 h de cultivo.

En las Figuras 50 – 54, se muestran las microfotografías correspondientes a 360h cultivo para cada una de las unidades experimentales y ausencia de proteína como ME.

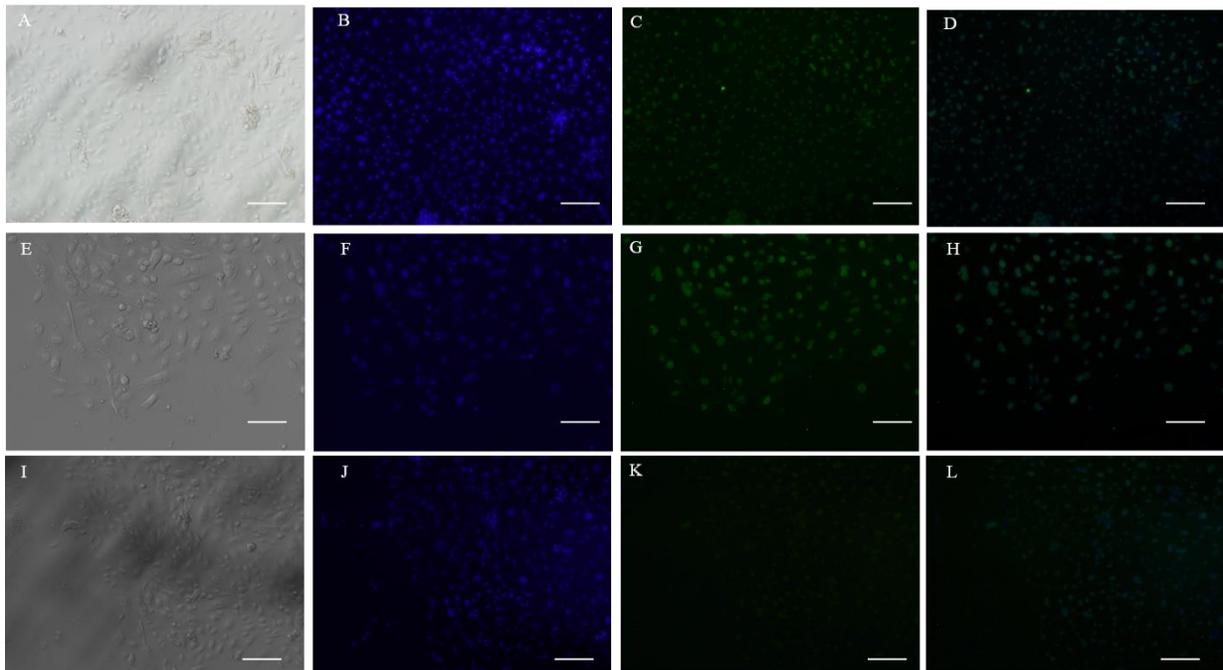
Figura 50, se revelan la microfotografías para el cultivo de CTEL en ausencia de ME, en la cual el crecimiento se vio detenido en comparación con el intervalo de tiempo anterior, así mismo se siguen presentando clonas que no rebasan los 500  $\mu\text{m}$  de longitud, las células son fusiformes con inmuno-fenotipo negativo a CK3 y a p63- $\alpha$ . Por lo tanto la pureza del cultivo se ve afectada por esta morfología no identificada.

Figura 51, se evidencian las microfotografías del cultivo que tuvieron Colágeno tipo I como ME, cabe destacar que las clonas independientes se unieron, en una clona con un área mayor de 600 $\mu$ m de diámetro, la cual abarca más del 40% del pozo de cultivo. Con respecto a la morfología, se siguieron presentando células pequeñas, con un núcleo grande, no se presentaron células fusiformes. La pureza del cultivo es de 90%.

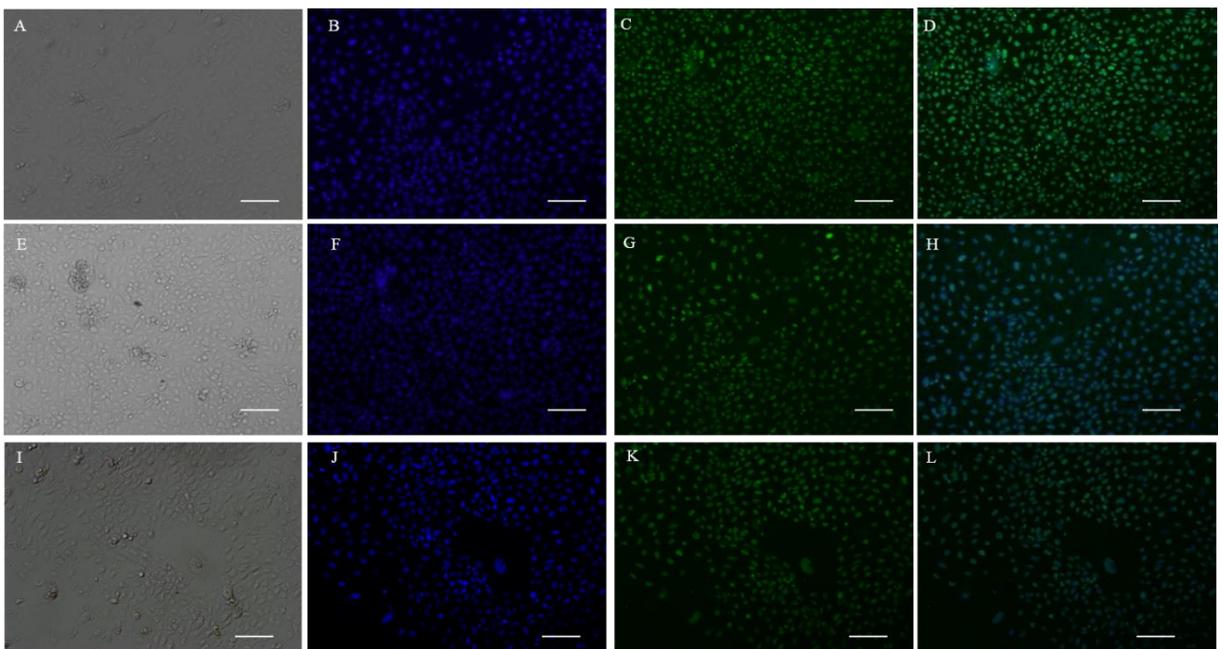
Figura 52, se hace presente el cultivo de células que se derivaron en Colágeno tipo IV, la cual hace notar un decremento en la población celular p63- $\alpha$ + con respecto a su intervalo de tiempo anterior. Se siguen evidenciando las clonas de manera individual, y la morfología característica de las CTCL no ha cambiado desde su inicio. Cabe destacar que no hubo crecimiento de células fusiformes en esta ME.

Figura 53, se revelan las microfotografías para los cultivos con Fibronectina como ME, se muestra a una pequeña población de células p63- $\alpha$  +, que no figuran a un crecimiento clonal. Sin embargo las células positivas al inmuno-fenotipo deseado son de la morfología normal para una CTCL (antes ya descrita). Cabe resaltar que existe el crecimiento de células fusiformes que no son positivas a ningún marcador buscado en esta investigación.

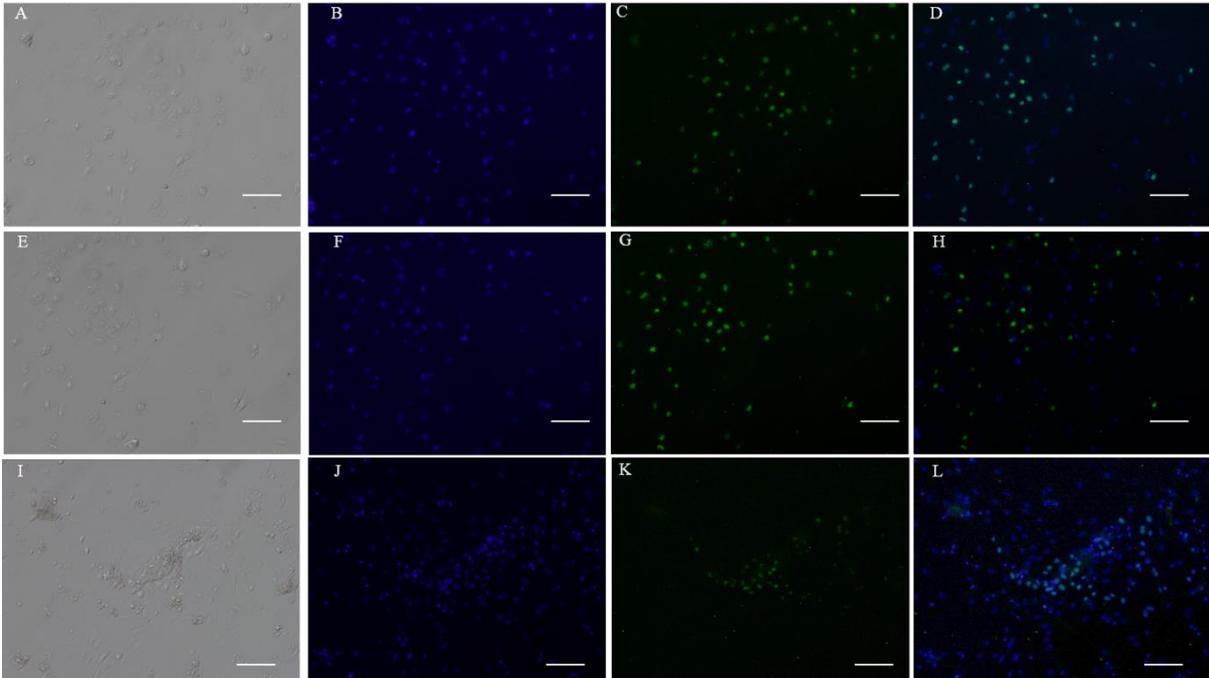
Figura 54, se muestra el cultivo celular de Laminina como ME, la cual revela que no existe un crecimiento en esta proteína para el inmuno fenotipo deseado, además de ser fusiformes CK3- y p63- $\alpha$  - .



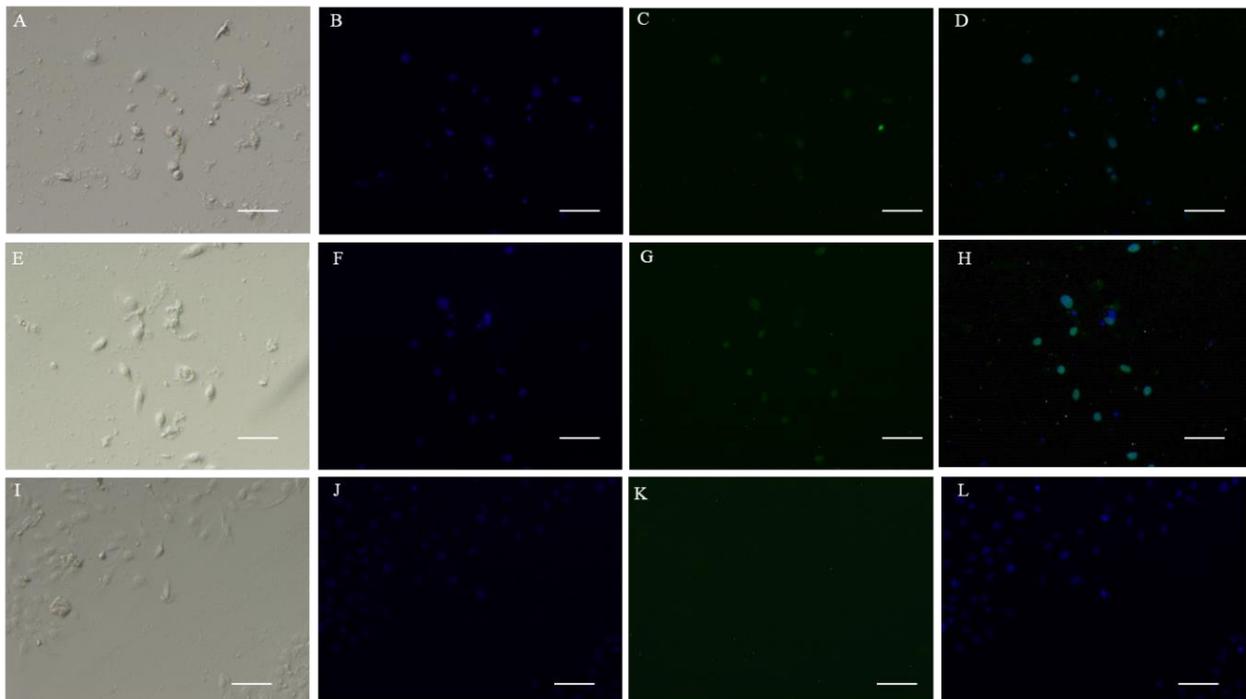
**Figura 50** Microfotografías de inmunocitoquímica de la ausencia de ME, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) La escala representa 100 $\mu$ m



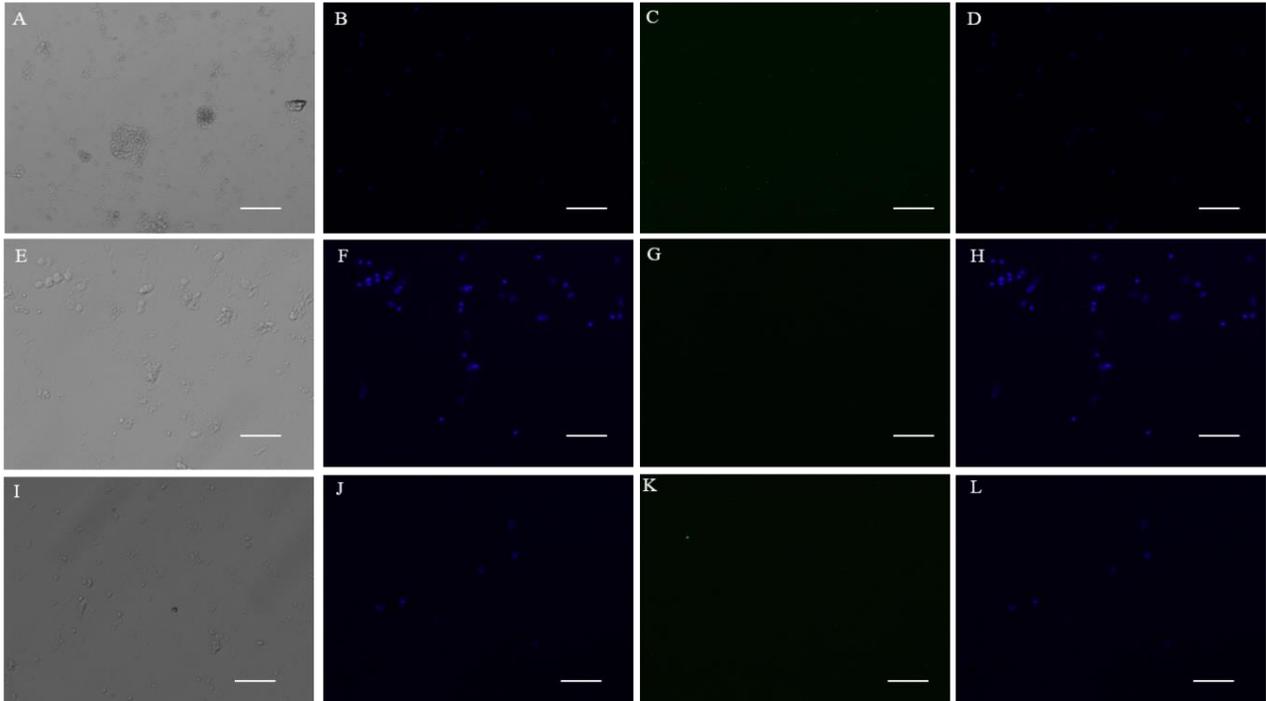
**Figura 51** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno tipo I, a 360h (15 días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) la escala representa 100 $\mu$ m



**Figura 52** Microfotografías de inmunocitoquímica de Colágeno IV, a 360h (15días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) la escala representa 100 $\mu$ m.

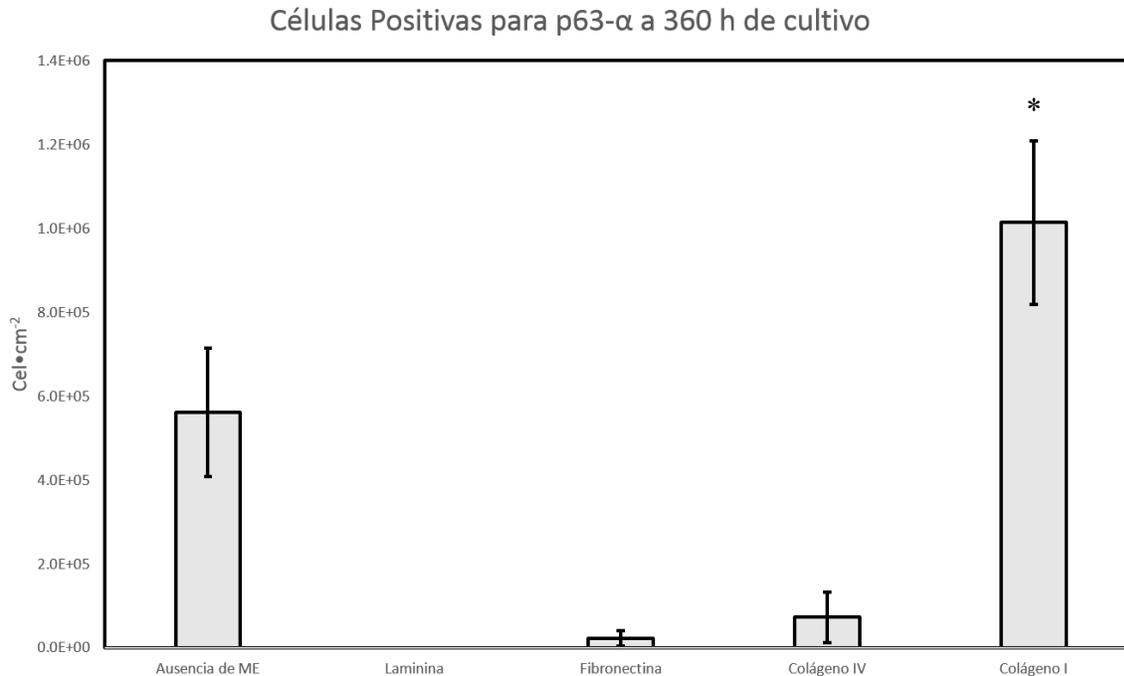


**Figura 53** Microfotografías de inmunocitoquímica de Fibronectina, a 360h (15días) de cultivo. Se muestran a las CTCL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) la escala representa 100 $\mu$ m.



**Figura 54** Microfotografías de inmunocitoquímica de Laminina, a 360h (15días) de cultivo. Se muestran a las CTEL en verde. A),E),I) Células en campo claro, B),F),J), Tinción del núcleo celular con DAPI. C),G),K) Células positivas para p63- $\alpha$ + en verde. D),H),L) Unión de la microfotografía tomada con DAPI y la microfotografía con Células p63- $\alpha$ +. (10X) .La escala representa 100 $\mu$ m.

En la Figura 55 se muestran los promedios de las CTEL (p63+) cuantificadas en 9 microfotografías, correspondientes al pozo de cultivo de cada una de las unidades experimentales (Ausencia de ME, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I). Se corrobora un incremento de la población de CTEL en Colágeno tipo I, posee diferencia estadísticamente significativa comparándola con la unidad experimental sin proteína como ME ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0023$ ).



**Figura 55.** Se muestran las células p63- $\alpha$  por centímetro cuadrado a 360h (15 días) de cultivo. El asterisco (\*) indica la existencia de diferencias significativas entre Colágeno tipo I contra todas las demás unidades experimentales ( $p=0.0023$ ,  $\alpha=0.05$ ).

## 9.6 Evaluación de la expansión celular.

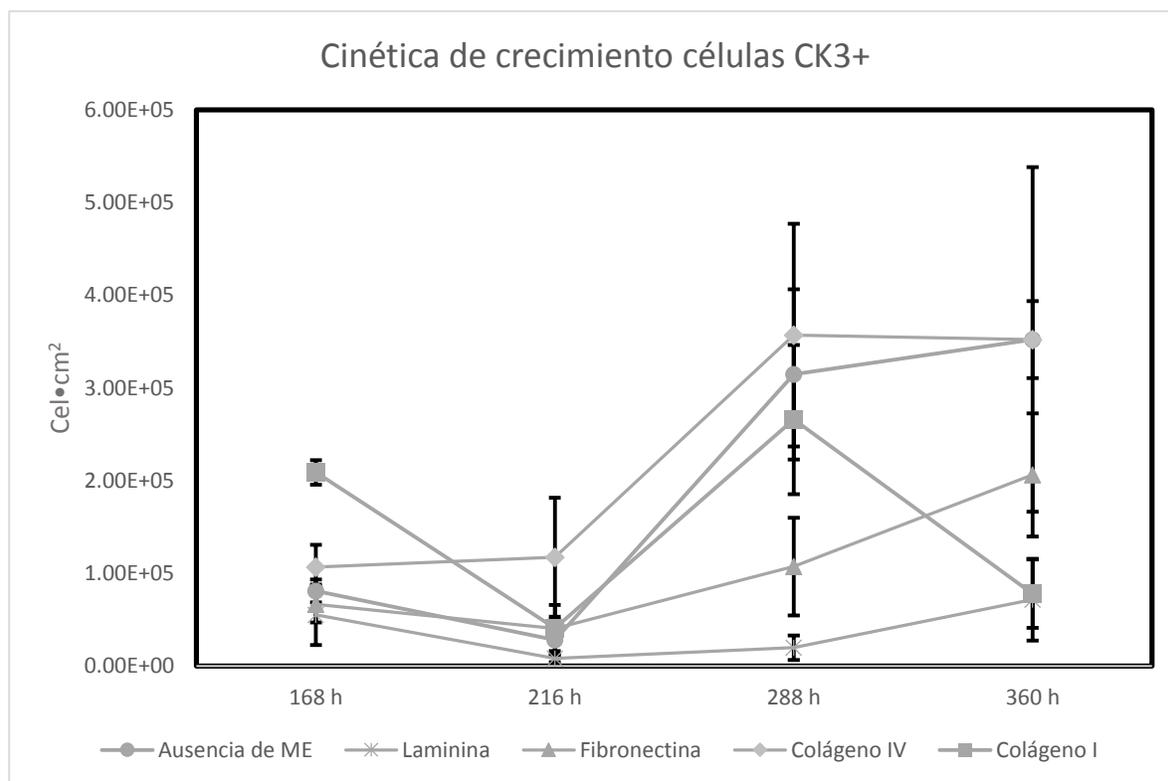
Se recopilaron los datos del conteo celular para los inmunofenotipos positivos para cada uno de los marcadores. En la Figura 56 se puede apreciar la cinética de crecimiento de las células CK3+, se observa que las poblaciones celulares son similares al inicio, del cultivo; sin embargo, al transcurrir 216h se observa un decremento en la concentración de células cultivadas en Fibronectina, Laminina, Colágeno I y la Ausencia de ME, opuesto a lo que ocurre con las células cultivadas en Colágeno tipo IV, en donde se observa un incremento en la concentración celular.

En el periodo de 216 – 260 h de cultivo, se observa la fase exponencial para cada una de las poblaciones por matriz extracelular. Por otro lado, se observa que a las

## 10. Discusión

260 h de cultivo, alcanzan el punto máximo de expansión celular los cultivos con Colágeno IV, Colágeno I y ausencia de proteína como ME; una vez alcanzado este intervalo se aprecia la fase de senescencia para colágeno tipo I.

Todas las condiciones experimentales planteadas, permitieron realizar la expansión de células epiteliales corneales (CK3+), debido a que el número inicial de células positivas para CK3 en la cinética de crecimiento (168h), es inferior al intervalo de la expansión celular a 360h de cultivo. Sin embargo, se evidencia la expansión selectiva al utilizar colágeno tipo IV o la ausencia de matriz extracelular.



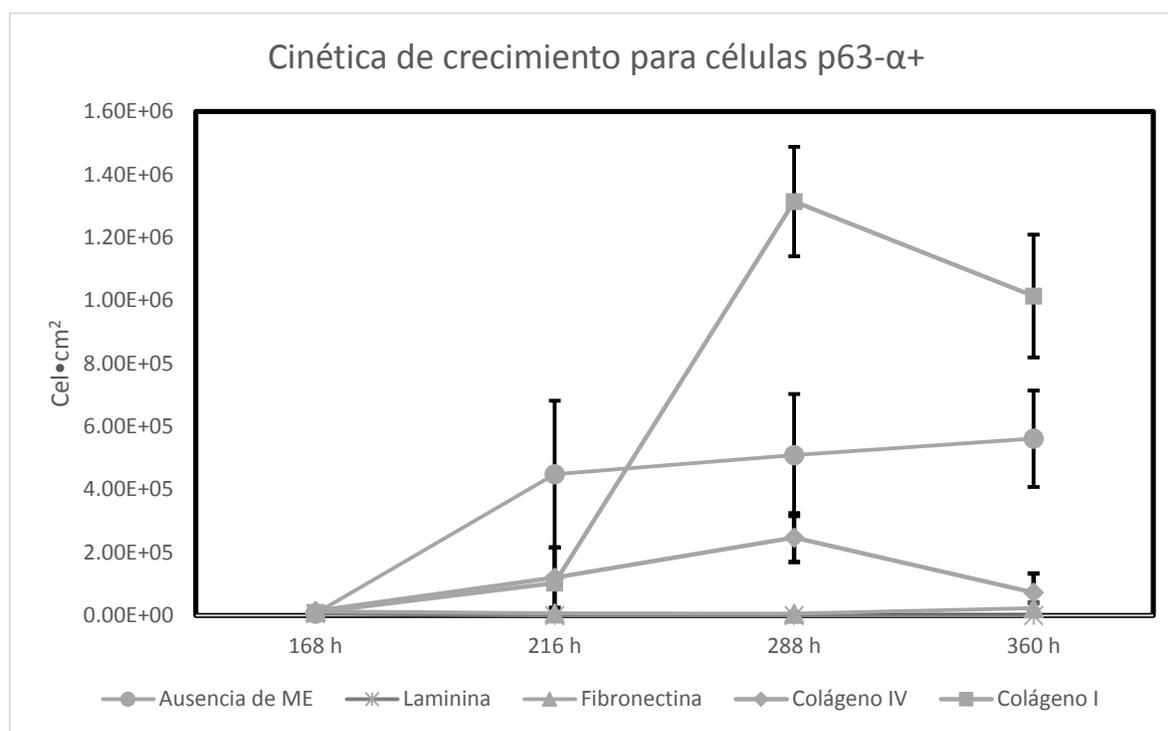
**Figura 56** Cinética de crecimiento de las células epiteliales (CK3+) durante 360h de cultivo. Se observa la fase exponencial entre las 216 y 288 h para colágeno IV, colágeno I y ausencia de ME. La fase de senescencia para colágeno I se presentó a partir de las 288 h de cultivo.

Por otra parte en la Figura 57 se muestra la cinética de crecimiento de las células

## 10. Discusión

Troncales Epiteliales Limbales ( $p63\alpha+$ ). Se observa que la concentración celular al inicio de la cinética de crecimiento es similar. A las 216 h de cultivo no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en este intervalo de tiempo; sin embargo, se observa una etapa de crecimiento exponencial únicamente para la condición de cultivo en Colágeno tipo I, en el periodo de 216 h a 288 h de cultivo.

Se observa que la máxima concentración de CTCL se obtiene a las 288 h de cultivo, utilizando colágeno tipo I como matriz extracelular; siendo al menos un logaritmo de diferencia con los otros tratamientos. Para los cultivos con Colágeno tipo I y tipo IV, se observa un decremento en la concentración celular atribuible a fase de senescencia a partir de las 288 h de cultivo; mientras que para la ausencia de proteína se observa un escaso crecimiento. No se observó una expansión celular con el uso de Laminina y Fibronectina durante las 360 h de cultivo.



**Figura 57** Cinética de crecimiento de las CTCL durante 360h de cultivo. Se observa la fase exponencial entre las 216 y 288 h para colágeno I, 168h y 216 para las células sin ME. En Colágeno IV hay una caída del cultivo a partir de las 288 h y en Fibronectina se muestra que no hubo crecimiento de CTCL.

## **10. Discusión**

El empleo de un proceso enzimático-mecánico en la derivación celular proporcionó una obtención homogénea de la población celulares directas de los rodetes, en un futuro se tratará de inocular una cantidad exacta en los pozos de cultivo con la finalidad de homogenizar la concentración celular al inicio del cultivo; caso contrario a los reportes que ocupan explantes como forma de obtención de las diferentes líneas celulares en donde la concentración de células inoculadas es un parámetro de cultivo no controlado (Alaminos *et al.*, 2006; Pelligrini *et al.*, 1997,).

El uso de un modelo animal (conejo) se realizó con la intención de estandarizar la metodología y optimizar los parámetros de aislamiento y expansión *in vitro* de las CTEL; además de ser un modelo ideal por la cantidad de CTEL (Ghafar *et al.* 2014); a partir de este proyecto se derivará más con rodetes esclero-corneales humanos (Ver anexo 3).

Los reportes de Luna-Baca *et al.*, 2005; McIntosh *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014; Levis *et al.*, 2010, sugieren el uso de agentes xenobióticos como membrana amniótica, suero fetal bovino, células fibroblásticas de ratón “3t3”, entre otros, como bases para una aplicación clínica en humanos, por el simple hecho de que aún no se han reportados daños adversos. Sin embargo nuestros resultados sugieren la posibilidad de derivar líneas celulares corneales como CTEL y células epiteliales corneales, en medios químicamente definidos, que al saber su contenido específico se puede asegurar que el producto a entregar está libre de agentes que pueden poner en riesgo a un paciente.

Con respecto a los fenotipos encontrados tenemos que las células epiteliales corneales, tuvieron dos formas muy particulares, las primeras y más abundantes (Colágeno tipo I, Colágeno tipo IV, Laminina y Fibronectina), fueron células

relativamente pequeñas, con forma circular, siendo así características de las células “TAC” (Pellegrini *et al.*, 2001). Por otro lado en los pozos de cultivos sin tratamiento se encontraron células de mayor tamaño de forma cuboidal (Fig 17; 26), éstas células son muy similares en morfología a lo antes reportado por (Levis *et al.*, 2010, McIntosh *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2014) esta morfología celular es la base del epitelio estratificado corneal. (Osei-Bempong *et al.* 2012).

El fenotipo de las CTCL se reporta que son células que se encuentran en clonas, poseen gran núcleo (abarcando más del 50% del citoplasma) y de forma circular además de ser positivos al marcador p63- $\alpha$ . Las células derivadas en nuestros cultivos cumplen con estas características, nuestras microfotografías para CTCL son muy similares a lo ya reportado (Luna-Baca *et al.*, 2005; Alaminos *et al.*, 2006 y Watanabe *et al.* 2004), sin embargo es importante mencionar que estos grupos de investigación no realizaron sus cultivos en medios químicamente definidos.

Cabe mencionar que hubo un tercer fenotipo presente en los cultivos celulares (Figuras 11, 12, 17), esta línea celular es alargada, fusiforme y a veces con forma dendrítica; los cuales se identifican como queratocitos (Ghafar *et al.* 2014), su presencia en nuestros cultivos celulares fue debido al raspado mecánico de los rodetes esclero-corneales, al aplicar mayor fuerza se pudo haber desprendido del estroma corneal, se propone el uso de una malla de 70 $\mu$ m con el fin de purificar los cultivos celulares.

El mantenimiento de la troncalidad, proliferación y migración toma lugar en la membrana basal del epitelio, debido a las células que abandonan esta membrana basal sufren cambios fenotípicos convirtiéndose en células TAC (Potten & Loeffler, 1990; Tseng, 1996; Cheng *et al.* 2009).

Los resultados evidencian a las principales proteínas como matriz extracelular, utilizados para el cultivo *in vitro* de las dos líneas celulares derivadas; en lo que

corresponde a células corneales (CK3+), observamos que no existe una proteína predilecta para su crecimiento, esto lo corroboramos debido a que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los intervalos de tiempo. Así mismo en cuestión de expansión celular para obtener una mayor cantidad de células CK3+ de fenotipo cuboidal (5,000 cel•cm<sup>2</sup> aprox.) se recomienda la ausencia de ME, pero si se busca el fenotipo circular y menor a 40µm el uso de colágeno IV sería la mejor opción (Figura 57).

En contraste se encontró que en las células p63+ (CTEL) una ME optimiza la expansión selectiva (90% de la población), esta fue Colágeno tipo I. Otros autores ya la habían sugerido como predilecta, pero solo era en un lapso de 24 h para realizar un gradiente de adhesión (Daniels *et al.*, 2006; McIntosh *et al.*, 2009), sin embargo nuestros resultados sugieren su cultivo a 260 h. Se encontraron en ambas cinéticas de crecimiento que la fase exponencial de los cultivos está dentro de los tiempos 216h – 260h (9-12 días) de cultivo (Figura 58).

La ausencia de expansión celular en Laminina, pudo haber sido porque esta proteína se encuentra expresada en la ME de células endoteliales y en el limbo esclero-córneoal no es la excepción, ya que se encuentra regionalizada cerca de la Membrana de Descemet, esta propiedad regionalización pudo haber afectado a la nula adhesión de las CTCL, debido a que de manera natural no se encuentran en contacto directo con algún tipo de células endoteliales, este es el mismo efecto análogo que se supone de Fibronectina (Mei *et al.*, 2012; Schlötzer *et al.*, 2007).

Caso contrario al colágeno, ya que es una proteína que en su estado natural en el humano se encuentra en forma de fibras, estas a su vez, permiten flexibilidad y rigidez de los diferentes tejidos en los que se ha localizado, es ampliamente conocido que es uno de los principales componentes de la córnea (Hogan *et al.*, 1971 y Kamma-Logger *et al.*, 2011). El colágeno tipo IV y tipo I son altamente

expresadas en el epitelio conjuntival, y en el limbo al ser una zona de transición encontramos su expresión (Fukuda 1999, Li *et al.*, 2005).

La adherencia y crecimiento de los cultivos celulares en ausencia de ME, es debido a que las placas de cultivo se adquirieron con un tratamiento de fábrica, la cual son pre-tratadas electropositivamente por parte del proveedor (Costar). Esta carga positiva no influye en las cascadas de señalización y es completamente libre de contaminantes animales. Ésta carga positiva ayuda a la interacción electroestática con las cargas negativas de la membrana celular, lo cual promueve la adherencia de los cultivos celulares. Sin embargo, a pesar de que fue posible la expansión de ambos tipos celulares (Células epiteliales y CTEL) en ausencia de ME, estos cultivos contienen otros tipos celulares no identificados, mismos que pueden considerarse contaminantes en caso de buscar poblaciones celulares puras. En el caso de la proteína Colágeno tipo I para CTEL, se obtuvo una **expansión selectiva** de CTEL con una pureza del 90%.

Se propone que para poder derivar un mayor número de CTEL se deben de sub-cultivar en la fase exponencial que corresponde a las 240h de cultivo en colágeno tipo I, además esta proteína puede ser utilizada como material para la elaboración de un andamio, esto es con fines de recrear un sustituto corneal en 3D que posea las 3 principales capas de la córnea (Epitelio corneal, Estroma y Membrana de Descemet).

### 11. Conclusiones

- Es factible realizar la **expansión selectiva** de CTEL (P63- $\alpha$ +) sin el uso de células alimentadoras o Membrana amniótica alcanzando una pureza del 90%.
- El proyecto ha contribuido en la identificación de los inmuno-fenotipos de las células corneales y CTEL, cultivadas en medios químicamente definidos.
- Se identificó que la fase exponencial de células epiteliales corneales (Ck3+) se encuentra entre los tiempos 216h y 266h de cultivo.
- Se logró una expansión celular mayor ( $3.5E+05$  cel $\cdot$ cm $^{-2}$ ) en la matriz de Colágeno tipo IV a 360h de células epiteliales corneales (CK3+); con un total de  $3.5E+06$  células por pozo.
- Se logró una expansión celular mayor ( $1.30E+06$  cel $\cdot$ cm $^{-2}$ ) en la matriz de Colágeno tipo I a las 288h de CTEL (p63- $\alpha$ +) con un total de  $1.30E+07$  células por pozo.
- Este trabajo sugiere una expansión en Colágeno tipo I como matriz extracelular para las CTEL (p63- $\alpha$ ) en los tiempos 216 h y 260h de cultivo.
- Es posible obtener sustitutos corneales (3D vs 2D) provenientes de anillos esclero-corneales, a partir de la expansión selectiva de CTEL, en medios químicamente definidos.

## 12. Perspectivas

Este estudio es la primera parte del proyecto titulado: “*Desarrollo de un hidrogel biocompatible basado en colágeno como un sistema de expansión in vitro de células troncales epiteliales limbales (CTEL) para su potencial uso en terapia regenerativa de córnea humana*”. El objetivo global, es la construcción *in vitro* de un sustituto corneal humano a partir de rodetes esclero-corneales remanentes de trasplante de queratoplastia para su posible aplicación clínica a futuro.

La estandarización de la técnica de derivación y la selección de la matriz extracelular óptima para la expansión y cultivo de las CTET; es fundamental para tener proponer la composición principal del andamio, que además de ser selectivo para la expansión *in vitro* de las CTET, permitirá proponer cultivo en 3D utilizando medios químicamente definidos.

De acuerdo a estudios previos (Ghezzi *et al.*, 2015; Ionescu *et al.*, 2011) se concluye de que apartir de un rodete esclero corneal, y después de 4 semanas de expansión se recupera un total de 2,000,000 de células; lo que equivaldría a la elaboración de un sustituto corneal en 3D.

Esto genera diferentes ventajas; ya que si en un futuro se llagará esta aplicación al ámbito clínico se podrían reducir el número de personas que esperan un donador de córnea.

## 13. Literatura Citada

- Ahmad S., Kolli S., Lako M., Figueiredo F., Daniels J.T. "Stem Cell Therapies For Ocular Surface Disease". 2010. *Drug Discovery Today* 15; 7-8:306-331.
- Alaminos M., Sanchez-Quevedo M.C., Muñoz-Avila J.I., Serrano D., Mendiáldea S., Carreras I. & Campos A. "Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:3311-3317.
- Amat D., Becerra J., Medina M.A., Quesada A.R. and Marí-Beffa M. *Embryology Updates and Highlights on Classic Topics, Stem Cell Therapies*. ISBN: 978-953-51-0465-0, InTech.España, Málaga. 2012; 8: 173 -187.
- Barrandon Y., Green H.. "Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication". *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2302–2306.
- Burgess R. "Stem Cells Handbook: Introduction to Stem Cells". 2013 Human Press 2ª edición. EUA, NY.
- Can A. "A concise review on the classification and nomenclature of stem cells". *Turk Hematol* 2008; 25: 57-9.
- Chae J., Ambrose W.M., Espinoza F.A., Mulreany D.G., Shengyong N., Takezawa T., Trexler M.M., Schein O.D., Chuck R.S. & Elisseeff J.H. "Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal Stem cell deficiency". *Acta Ophthalmol*. 2015: 93 (1) 57-66.
- Chen Z., De Paiva C.S., Luo L., Kretzer F.L., Pflugfelder S.C., Li D.Q. "Characterisation of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia". *Stem Cells* 2004; 22: 355–366.
- Daniels, J.T., Dart, J.K., Tuft, S.J., Khaw, P.T. "Corneal stem cells in review". *Wound Repair and Regeneration* 2001: 9(6); 483-494.
- Davenger M., Evensen A. "Role of the pericorneal papillary structure in the renewal of corneal epithelium". *Nature* 1971; 229(5286):560-1.
- Di Iorio E., Barbaro V., Ruzza A., Ponzin D., Pellegrini G., De Luca M. "Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 9523 – 9528.
- Du Y., Funderburgh M., Mann M.N., SunderRaj N., Funderburgh J.L. "Multipotent stem cells in human corneal stroma". *Stem Cells* 2005; 23: 1266–1275.
- Dua H.S., Shanmuganathan V.A., Powell-Richards A.O., Tighe P.J., Joseph A. "Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche". *Br J Ophthalmol* 2005; 89:529–532.
- Fini M.E., Stramer B.M. "How the cornea heals: cornea-specific repair mechanism affecting surgical outcomes". *Cornea* 2005; 24: S2–S11.

### 13. Literatura Citada

- Fiorica C., Senior R.A., Pitarresi G., Palumbo F.S., Giamona G., Deshpande P. MacNeil S. "Biocompatible hydrogels based on hyaluronic acid cross-linked with polyaspartamide derivative as delivery systems for epithelial limbal cells". *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 414:104-111.
- Fukuda K., Chikama T., Nakamura M., Nishida T. "Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva". *Cornea* 1999; 18 (1): 73-79.
- Funderburgh M.L., Du Y, Mann MN, SunderRaj N., Funderburgh J.L. "PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes". *FASEB J* 2005; 19: 1371-1373.
- Ghafar A.N., Chua K.H., Wan N.W.Z., Che H.J., Othman F., Abd-Rahman R., Hj I.R. "Phenotypic characterization of culture expanded rabbit limbal corneal keratocytes". *Cell Tissue Bank* 2014; 1: 25-34.
- Ghezzi CH. E., Rnjak-Kovacina J. and Kaplan L.D. "Corneal Tissue Engineering: Recent Advances and future perspectives". *Tissue Engineering: part B* 2015; 21 (3): 278-287.
- Gilbert S.F. *Biología del desarrollo, Implicaciones medicas de la biología del desarrollo*. 7ª Edición. México, D.F., Médica Panamericana 2005; 21: 750-759.
- Hanna C, O'Brien JE. "Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea". *Arch Ophthalmol* 1990; 64: 536-539.
- Hashmani K., Hopkinson A., Branch M., Dua H.S. "Corneal Stromal Stem Cells". *IOVS* 2011; 52 (14): 5151.
- Hay E.D., Linsenmayer T.F., Trelstad R.L., Von der Mark K. "Origin and distribution of collagens in the developing avian cornea". *Curr Top Eye Res* 1979; 1: 1-35.
- Hogan M.J., Alvarado J.A., Weddell J.E. "The cornea: Histology of the Human Eye. WB Saunders, Philadelphia 1971.
- Holland S, Leba CQZ, Zoloth L. "The Human Embryonic Stem Cell: Science, Ethics and Public Policy". 1ª Ed. USA, 2001; pp: 1-50.
- Hsu Y.Ch., Li L., Fuchs E. "Transit-Amplifying Cells Orchestrate Stem Cell Activity and Tissue Regeneration", *Cell* 2014 157; 4: 935-949.
- Ionescu A.M., Alaminos M., Cardona J. de la C., García-López J. de D., González-Andrades M. et al., "Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties". *J MECH BEHAV BIOMED* 2011; 4: 1963-1973.
- Jester J.V., Moller-Pedersen T., Huang J., Sax C.M., Kays W.T., Cavanagh H.D., *et al.* "The cellular basis of corneal transparency: evidence for corneal crystallins". *J Cell Sci* 1999; 112: 613-622.
- Kaufman P. L., Alm A., Levin L.A., Nilsson S.F.E., Hoeve J.V. & Wu S. "Adler Fisiología del Ojo Aplicación clínica". 11ª Edición Elsevier, España. 2011: 60 – 70 pp.
- Kelly E. B. "Stem Cells: Chapter 1 Stem Cells". 2007 Westport. Greenwood Press, EUA 1a Edición.
- Khurana A.K. "Comprehensive Ophthalmology: Anatomy and Development of the Eye".

### 13. Literatura Citada

2014. New Age International, New Delhi 4<sup>th</sup> Edition.

- Kinoshita S., Friend J., Thoft R.A. "Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21: 434–441.
- Klyce S.D. "Electrical profiles in the corneal epithelium". *J Physiol* 1972;22 :407–429.
- Kurpakus M.A., Stock E.L., Jones J.C. "Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 3:, 448–456.
- Levis H.J., Brown R., Daniel J.T. "Plastic compressed collagen as biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture". *Biomaterials*. 2010; 31: 7726 – 7737.
- Li D.Q., Chen Z., Song X.J., de Paiva C.S., Kim H.S., Pflugfelder S.C. "Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness." *Exp. Eye Res.*. 2005; 80(4):581-90.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J. "Molecular Cell Biology". Panamericana. México D.F. 5<sup>a</sup> edición.2005;22: 900-908.
- Luna-Baca G.A., Garfias Y., Robles-Contreras A. y Jiménez-Martínez M.C. "Caracterización fenotípica de células epiteliales limbales humanas expandidas in vitro". *Gac Méd Méx* 2007; 143 (3): 183-187.
- Ma D.H.K., Lai J.Y., Cheng H.Y., Tsai C.C. Yeh L.K. "Carbomiled cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells". *Biomaterials*. 2010; 31: 6647-6658.
- McIntosh W.A., Salahuddin A., So S., Ng S., Ponce S.M., Takezawa T., Schein O., Elisseeff J. "Collagen Vitrigel Membranes for the In Vitro Reconstruction of Separate Corneal Epithelial, Stromal, and Endothelial Cell Layers". *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009; 90B: 8180-831.
- Meek K.M., Dennis S., Khan S. "Changes in the refractive index of the stroma and its extracellular matrix when the cornea swells". *Biophys J* 2003; 85: 2205–2212.
- Mei H., Gonzalez S. & Deng S.X. "Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche". *J. Funct. Biomater* 2012; 3: 879-894.
- Mei H., Gonzalez S. and Deng S.X. "Review Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche". *J. Funct. Biomater* 2012; 3: 879-894.
- Mi S., Khutoryanskiy V.V., Jones R.R., Zhu X., Hamley I.W., Connon C.J. "Photochemical cross-linking of plastically compressed collagen gel produces an optical scaffold for corneal tissue engineering". *J Biomed Mater Res A*. 2011; 99(1): 1-8.
- Mondragon-Teran P., Baboo J., Mason C., Lye J.G. and Veraitch F.S. "The full spectrum of physiological oxygen tensions and step-changes in oxygen tension affects the neuronal differentiation of embryonic stem cells". *Biotechnology Progress* 2011; 27(6): 1700 – 1708.
- Mondragon-Teran P., Lye J.G., and Veraitch F.S. "Lowering oxygen tension enhances the differentiation of mouse embryonic stem cells into neuronal cells". *Biotechnology Progress* 2009; 25(5): 1480- 1488.
- Moore K. L. "Embriología clínica". Interamericana 4<sup>a</sup> Edición 1989 México pp 448.
- Mort R.L., Douvaras P., Morley S.D., Dorà N., Hill R.E., Collinson J.M., West J.D. "Stem cells and corneal epithelial maintenance: insights from the mouse and other animal

### 13. Literatura Citada

models". *Results Probl Cell Differ*, 2012; 55: 357-394.

- Muller L.J., Pels L., Vrensen G.F. "Novel aspects of the ultrastructural organisation of human corneal keratocytes". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2557–2567
- Mummery C., Wilmut S.I., Van de Stolpe A., Roelen B.A.J. "Stem Cells Scientific Facts and Fiction". United Kingdom, London. Elsevier.2011.
- Obokata H. & Vacanti C.A. "Principles of Tissue Engineering, Stem Cells in Tissue Engineering". Elsevier.2014; 31: 595- 608.
- O'Callaghan A.R., Daniels J.T. "Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges". *Stem Cells* 2011;19(12); 1923-1932.
- Organización Mundial de la Salud. [OMS] (2010)Blindness. Disponible en: [http://www.who.int/blindness/data\\_maps/VIFACTSHEETGLODAT2012\\_2.pdf](http://www.who.int/blindness/data_maps/VIFACTSHEETGLODAT2012_2.pdf)
- Osei-Bempong Ch., Henein Ch., Ahmad S. "Culture conditions for primary human limbal epithelial cells. *Regen Med* 2012; 4(3):461-470.
- Pajooresh-Ganji A., Stepp M.A. "In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium". *Biol Cell*. 2005; 97(4): 265-276.
- Pellegrini G., Traverso C.E., Franzi A.T., Zingirian M., Cancedda R., De Luca M. "Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium". *The Lancet* 1997; 349:990-993.
- Potten C.S. and Loeffler M. "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt". *Development* 1990; 110:1001-1020.
- Potten C.S., De Rooij D.G., Van Dissel-Emiliani. "Stem Cells Regulation of proliferation and differentiation of the stem cells in the male germ line". California,USA. Academic Press 1997:283-315.
- Rama P., Matuska S., Paganoni G., Spinelli A., De Luca M., Pellegrini G. "Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration". *N Engl J Med* 2010; 363:147-155.
- Ramos T., Scott D., Ahmad S. "An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva". *Stem Cells International* 2015; , Article ID 601731, 1-7 Pp.
- Romano A.C., España E.M., Yoo S.H., Budak M.T., Wolosin J.M., Tseng S.C. "Different cell sized in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 5125–5129.
- Schlötzer- Schrehardt U., Dietrich T., Saito K., Sorokin L., Sasaki T., Paulsson M., Kruse F.E. "Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment". *Experimental Eye Research* 2007; 85: 845 – 860.
- Schlötzer U., Kruse F. "Identification and characterization of limbal stem cells". 2005 *Experimental Eye Research*. 81 (3): 247-264.
- Secker G.A. and Daniels J.T. "Limbal epithelial stem cells of the cornea", *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, doi/10.3824/stembook.1.48.1.
- Shortt A.J., Secker G.A., Munro P.M., Khaw P.T., Tuft S.J., Daniels J.T. "Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells". *Stem Cells*, 2007; 25 (6): 1402 – 1409.

### 13. Literatura Citada

- Shortt A.J., Secker G.A., Rajan M.S., Meligonis G., Dart J.K., Tuft S.J., Daniels J.T. "Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells". *Ophthalmology* 2008; 115: 1899-1997.
- Silverthorn D.U., Johnson B.R., Garrison C.W., *Human Physiology*. 4ª Edición. México D.F., Panamericana 2007;3:81-84.
- Surani M.A. "Human Germline: A New Research Frontier". *Stem Cells Reports* 2015; 4(6): 955 - 960.
- Thoft R.A. and Friend J. "The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24: 1442-1443.
- Tseng S.C. "Concept and application of limbal stem cells". *Eye* 1989; 3:141 - 157.
- Villa C. and Santodomingo J. "La córnea. Parte I Estructura, función y anatomía microscópica". *Gac. opt.* 2010;454 :1-6.
- Watanabe K., Nishida K., Masayuki Y., Terumasa U., Taizo S., Kazuaki Y., *et al.* "Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2". *FEBS Lett* 2004;565:6-20.
- Watanabe K., Yamato M., Hayashida Y., Yang J., Kikuchi A., Okano T., Tano Y., Nishida K. "Development of transplantable genetically modified corneal cell sheets for gene therapy". *Biomaterials* 2007;28: 745 - 749.
- West J.D., Dorà J.N. and Collinson J.M. "Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance" *World J Stem Cells* 2015; 7(2):281-299.
- What are the similarities and differences between embryonic and adult stem cells?. In *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2011 [cited Monday, January 26, 2015] Available at <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics5.aspx>.
- Yamanaka Shinya. "A Fresh Look at iP Cells". *Cell* 2009;137: 13-17.
- Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., *et al.* "p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development". *Nature* 1999;398:714-718.
- Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J. *et al.* "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype". *Nat Med* 2001;9: 1028-1034.

## Anexo 1

Components of EpiLife® medium.

A sterile, liquid medium prepared without calcium chloride for the long-term, serum-free culture of human epidermal keratinocytes and human corneal epithelial cells. This basal medium requires the addition of calcium plus an appropriate supplement prior to use.

Calcium chloride is provided as a separate component with each bottle of medium. Below is the composition list. The concentrations are proprietary.

<b>Components</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>Concentration (mg/L)</b>	<b>mM</b>
Glycine	75.0	<b>Amino Acids</b>	n/a
L-Alanine	89.0	confidential	n/a
L-Arginine hydrochloride	211.0	confidential	n/a
L-Asparagine-H <sub>2</sub> O	150.0	confidential	n/a
L-Aspartic acid	133.0	confidential	n/a
L-Cysteine	121.0	confidential	n/a
L-Glutamic Acid	147.0	confidential	n/a
L-Glutamine	146.0	confidential	n/a
L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	210.0	confidential	n/a
L-Isoleucine	131.0	confidential	n/a
L-Leucine	131.0	confidential	n/a
L-Lysine hydrochloride	183.0	confidential	n/a
L-Methionine	149.0	confidential	n/a
L-Phenylalanine	165.0	confidential	n/a
L-Proline	115.0	confidential	n/a
L-Serine	105.0	confidential	n/a
L-Threonine	119.0	confidential	n/a

<b>Components</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>Concentration (mg/L)</b>	<b>mM</b>
L-Tryptophan	204.0	confidential	n/a
L-Tyrosine	181.0	confidential	n/a
L-Valine	117.0	confidential	n/a
Choline chloride	140.0	confidential	n/a
D-Pantothenic Acid	238.0	<b>Vitamins</b>	n/a
Folic Acid	441.0	confidential	n/a
Myo-Inositol	180.0	confidential	n/a
Niacinamide	122.0	confidential	n/a
Pyridoxal hydrochloride	206.0	confidential	n/a
Riboflavin	376.0	confidential	n/a
Thiamine hydrochloride	337.0	confidential	n/a
Vitamin B12	1355.0	confidential	n/a
d-Biotin	244.0	confidential	n/a
Ammonium Molybdate ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	1236.0	confidential	n/a
Ammonium metavanadate ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ )	117.0	confidential	n/a
Cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	250.0	<b>Inorganic Salts</b>	n/a
Ferric sulfate ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	278.0	confidential	n/a
Magnesium Chloride ( $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	203.0	confidential	n/a
Manganese Sulfate ( $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ )	169.0	confidential	n/a
Nickelous Chloride $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238.0	confidential	n/a

<b>Components</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>Concentration (mg/L)</b>	<b>mM</b>
Potassium Chloride (KCl)	75.0	confidential	n/a
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84.0	confidential	n/a
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	confidential	n/a
Sodium Meta Silicate Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	284.0	confidential	n/a
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	268.0	confidential	n/a
Sodium Selenite (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	173.0	confidential	n/a
Tin Chloride (SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	226.0	confidential	n/a
Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	288.0	confidential	n/a
Adenine.HCl	172.0	confidential	n/a
D-Glucose (Dextrose)	180.0	confidential	n/a
DL-alpha-Lipoic Acid	206.0	confidential	n/a
Ethanolamine	61.0	<b>Other Components</b>	n/a
HEPES	238.0	confidential	n/a
O-Phosphorylethanolamine	141.0	confidential	n/a
Phenol Red	376.4	confidential	n/a
Putrescine 2HCl	161.0	confidential	n/a
Sodium Pyruvate	110.0	confidential	n/a
Thymidine	242.0	confidential	n/a

## Anexo 2

Carta de aprobación del proyecto por parte del Comité de Investigación Científica del Comité de Bioseguridad y de la Comisión de Ética del C.M.N. "20 de Noviembre ISSSTE".



Instituto de Seguridad  
y Servicios Sociales  
para los Trabajadores  
del Estado



---

*C. M. N. "20 de Noviembre"*  
*Oficio No. 96.202.1.3.2./256/12*  
*México, D. F., 30 de abril de 2012*

*Asunto: Aceptación de Protocolo*

**Dr. Paul Mondragón Terán**  
*Investigador Principal*  
**Presente.**

Le comunicamos, que su proyecto de investigación titulado: **Desarrollo de un Hidrogel Biocompatible basado en colágeno como un sistema de expansión in vitro de células troncales epiteliales limbales (CTEL) para su potencial uso en terapia regenerativa de cornea humana** con número 008.2012 Número de San Fernando 134.2012 como resultado del proceso de revisión, en el que los integrantes de las Comisiones de Investigación y de Ética del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", dictaminaron **procedente** su realización.

A partir de este momento, **será responsabilidad del investigador principal**, realizar a satisfacción los objetivos del proyecto aprobado, así como **dar cumplimiento de lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a las buenas prácticas clínicas** que indican la Secretaría de Salud y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado; deberá cumplir ante esta Coordinación con los Informes trimestrales de la evolución del proyecto y del manejo de presupuesto total, anexando el listado y copia de la **carta de consentimiento bajo información de todos los pacientes** que participen, tales documentos deberán incluir el número de expediente, dirección, dirección electrónica y teléfono de cada uno de los pacientes reclutados en el entendido de que esta información será susceptible de ser auditada.

Es también **absoluta responsabilidad del investigador principal** notificar sobre cualquier evento adverso ocurrido en los pacientes en investigación tanto la Comisión de Ética a través de esta coordinación como a la Secretaría de Salud (COFOPROS) en el formato correspondiente y tiempos obligatorios al tipo de evento a reportar.

En documentos anexo se me proporciona información sobre el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y sobre el "Consejo de Salubridad General, la Comisión para la Certificación de Establecimientos de Atención Médica, Estándares para la Certificación de Hospitales en Investigación", documentos que me comprometo a leer minuciosamente y dar cabal cumplimiento.

De no acatarse estos lineamientos, además de la suspensión de la investigación, esta Coordinación no será responsable de las omisiones o incidencias civiles o penales a que se haga acreedor investigador principal.

Sin otro particular, quedo de usted

**Atentamente**



**Dra. Silvia García**  
Coordinación de Investigación

**Va. Bn.**



**Dra. Aura Escobedo Valle Salas**  
Subdirectora de Enseñanza e Investigación



**Dr. Paul Mondragón Terán**  
Aceptación del Investigador  
Fecha: 02 Mayo 2012

Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle Delegación Benito Juárez. CP. 03229 Tel. 52009005  
[www.issste.gob.mx](http://www.issste.gob.mx) [www.issste-cmnc20n.gob.mx](http://www.issste-cmnc20n.gob.mx) [com20investigacion@issste.gob.mx](mailto:com20investigacion@issste.gob.mx)

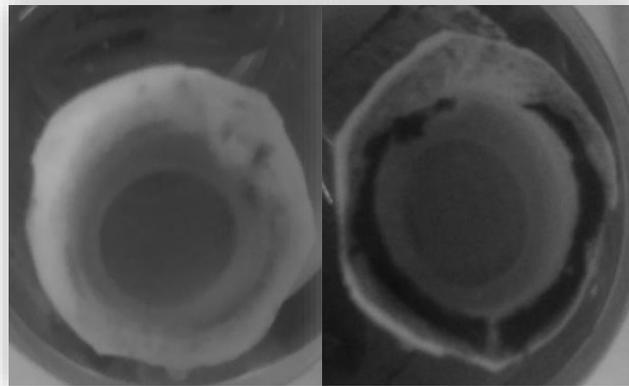
## Anexo 3

Resultados de pruebas preliminares en remanentes esclero-corneales de humano

### Anillos Esclero-corneales

El tejido humano fue obtenido de donadores cadavéricos. En los términos que indica la legislación vigente para el manejo de donación de tejidos. Se utilizó el tejido dentro de los primeros 15 días *post mortem*.

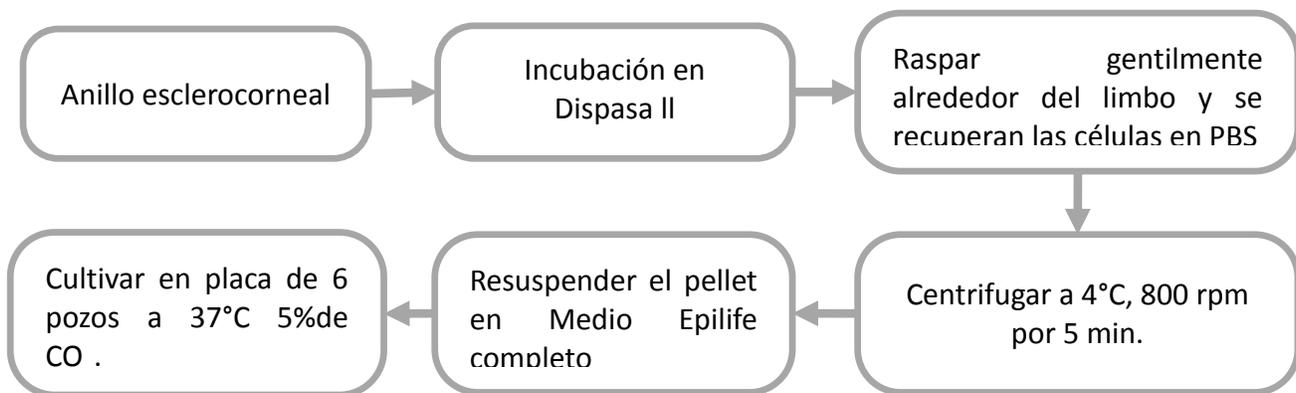
Se utilizó tejido esclerocorneal remanente de trasplante de córnea realizado en el Servicio de Oftalmología y Trasplante de Córnea del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”- ISSSTE y del Instituto de Oftalmología FAP Conde de Valencia IAP (Figura I)



**Figura I** *Anillo esclerocorneal remanente de queratoplastia.* En el lado Izquierdo se observa el lado anterior del anillo y de lado derecho el lado posterior, es necesario resaltar que la parte oscura del anillo son restos de iris.

### Aislamiento y cultivo de células troncales epiteliales limbales humanas

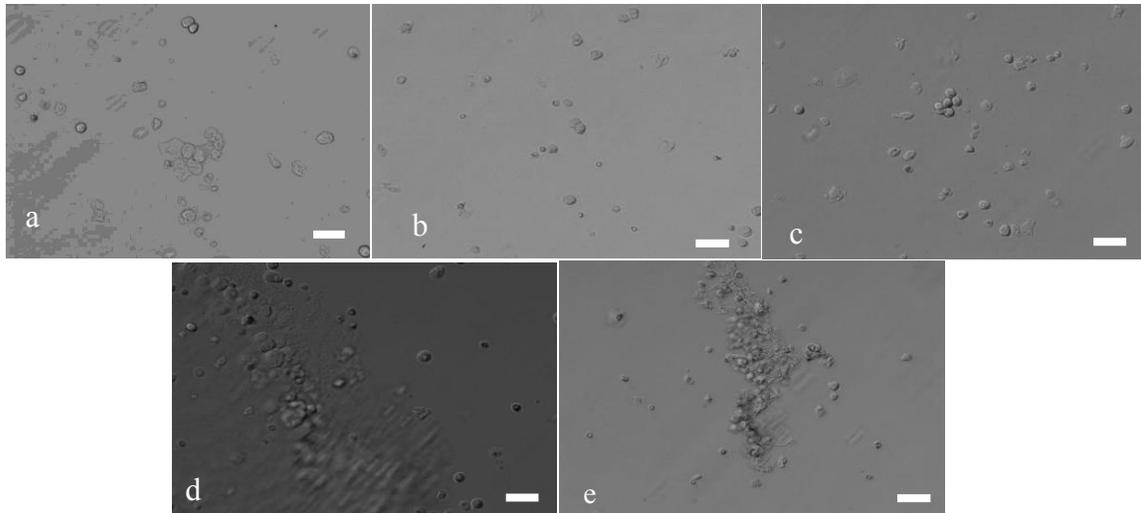
El aislamiento y cultivo se realizó de la misma manera que en el apartado N° 5. Materiales y Métodos, no obstante se adjunta un mapa conceptual haciendo hincapié en los aspectos más relevantes del procedimiento de aislamiento de las CTEL de humano (Figura II).



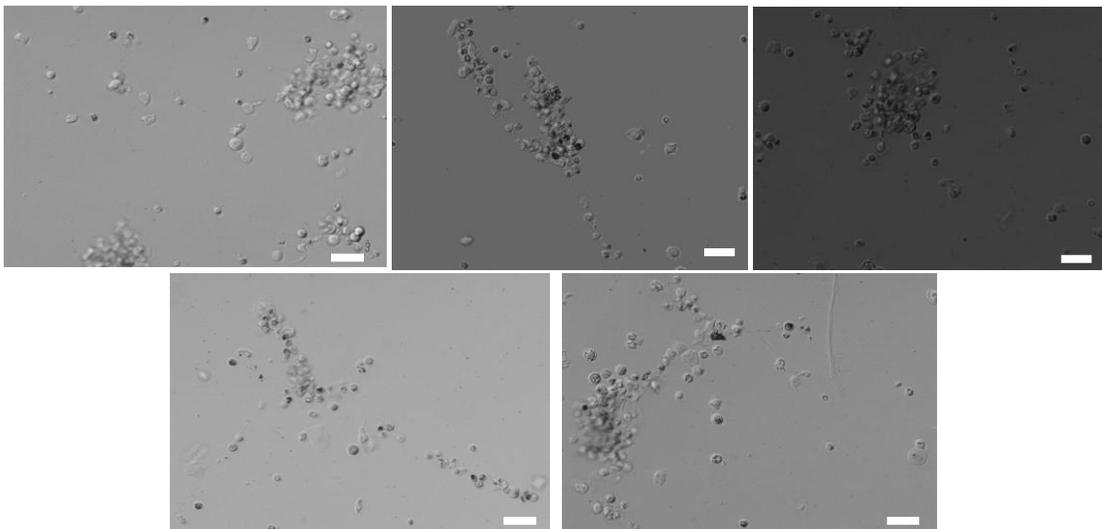
**Figura II** Diagrama de flujo de la metodología. Se muestran los pasos más importantes para llevar a cabo satisfactoriamente un cultivo de CTEL y de células epiteliales corneales.

### Microfotografías tomadas a diferentes tiempos de cultivo

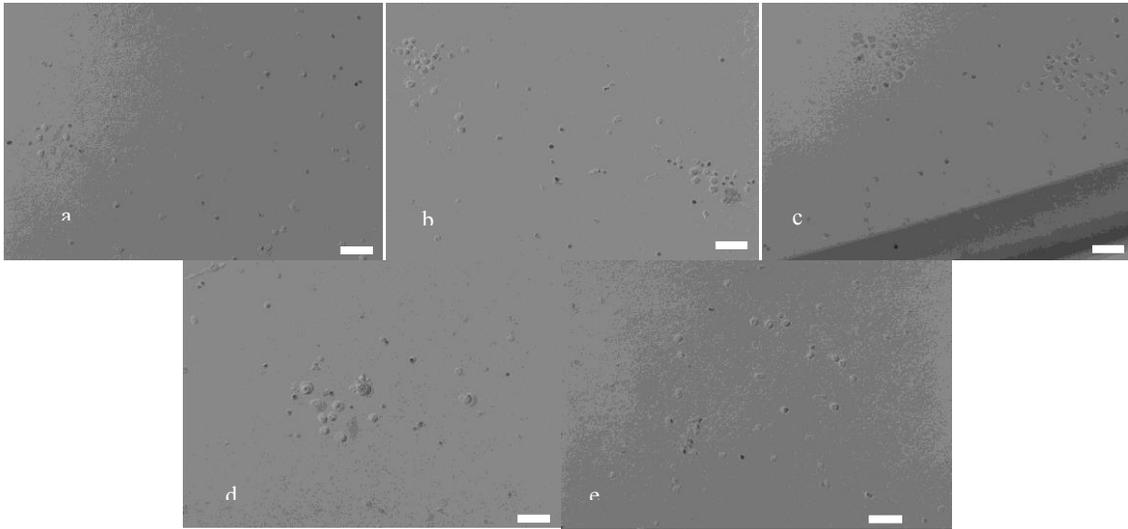
Se revelan fotos del cultivo de CTEL y células epiteliales corneales en los tiempos (2h, 48h, 96h y 144h), cabe resaltar que no se utilizó ninguna proteína como ME.



**Figura III** *Microfotografías a 2 h de cultivo.* Se observa a las células aisladas de limbo en las primeras horas después de su extracción, se presentan pequeñas colonias y una gran cantidad de células con una proporción núcleo/citoplasma. La escala representa 10 $\mu$ m.



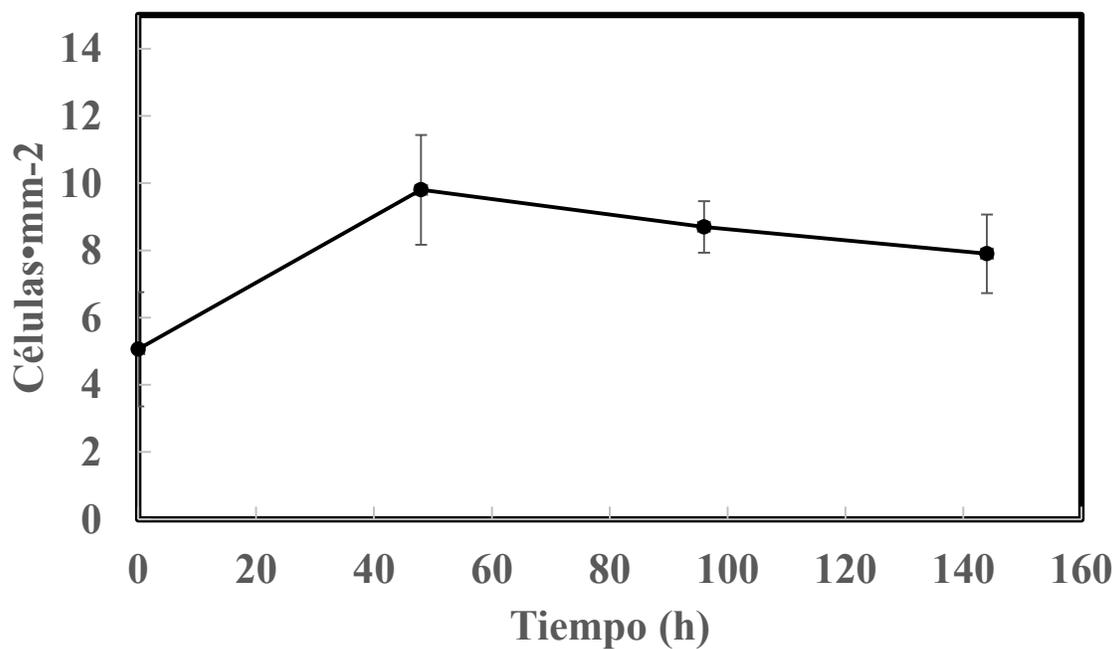
**Figura IV** *Microfotografías a 48 h de cultivo.* Se observa un incremento en la población celular. En las imágenes D y B se observa un arreglo celular en forma de filamento. La escala representa 10 $\mu$ m.



**Figura V.** Microfotografías a 144 h de cultivo. Se observa una disminución en el número de colonias. La escala representa 10 $\mu$ m.

### Cinética de expansión a 144h de cultivo

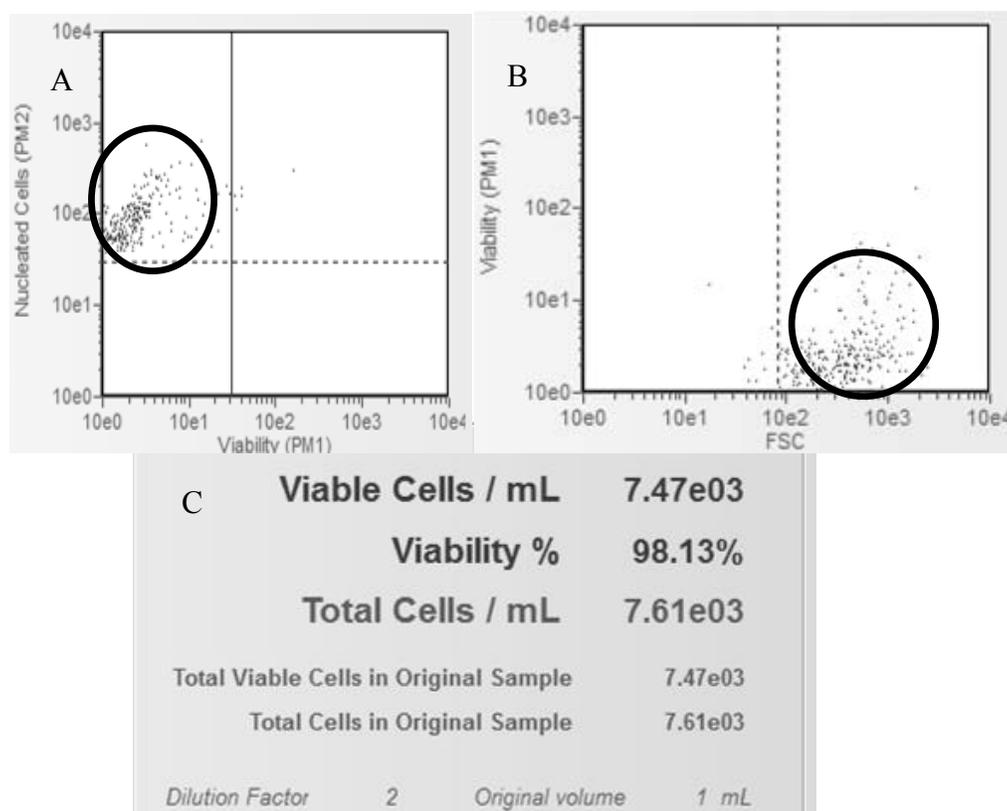
Se realizó una cinética de expansión de células totales, con ayuda de las microfotografías (Figura VI), En la cual se observa una fase exponencial durante las primeras 48h de cultivo, así mismo se observa que a partir de este tiempo empieza un decaimiento del cultivo celular, esto se le atribuye al medio ya que es un medio químicamente definido.



**Figura VI.** Cinética de crecimiento de las CTCL durante 144 h de cultivo. Se realizó un promedio con 6 microfotografías obtenidas por cada intervalo de tiempo.

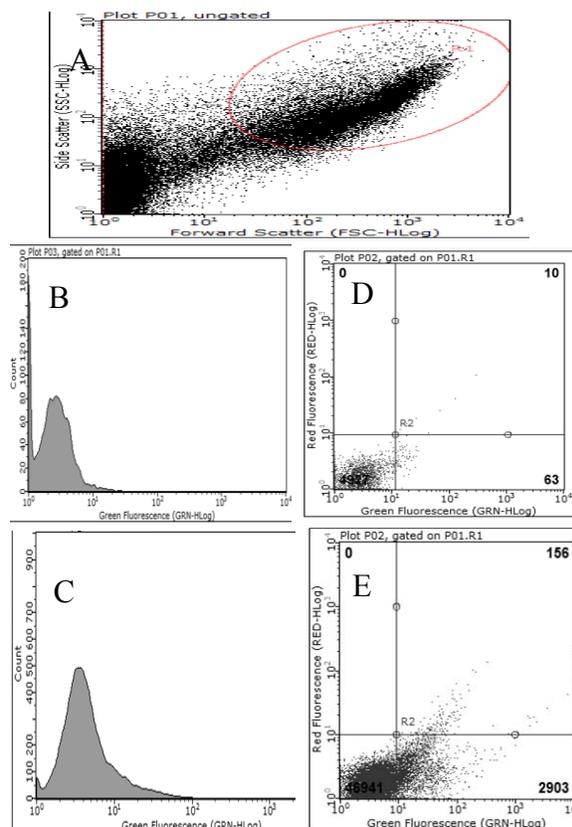
## Citometría de flujo

Con fines de complementar las pruebas pilotos, se realizó una prueba de viabilidad en el citómetro de flujo (Figura VII) en donde se observa la cantidad de células nucleadas que se obtuvieron de una muestra de células en suspensión (1mL.) (Figura VIIA). Así como la cantidad de células vivas, esto se determinó mediante el Kit Guava viacount (Merck, USA), que tiene como fundamento el uso de Ioduro de Propidio. En la Figura VII C apreciamos los porcentajes de viabilidad celular (98%) y número de células por mL (7,610 cel/mL). Estos datos nos ayudaron para proponer los intervalos de tiempo posteriores. Todos las adquisiciones de datos y análisis fueron realizados en el citometro Guava 5HT, con el software Guava Incyte.



**Figura VII.** Resultados obtenidos por citometría de flujo. A) Se observa la cantidad de células nucleadas (dentro del círculo) que se obtuvieron de una muestra de células en suspensión (1mL.). En la imagen B) se logra apreciar la cantidad de células vivas que se obtuvieron de la muestra (dentro del círculo). Y en la imagen C) se muestran los resultados de viabilidad celular 7,470 células viables por mL., Porcentaje de viabilidad 98.13%, y el número total celular que fue contado 7,610 células por mL.

En la Figura VIII se aprecia el análisis por Citometría de flujo en busca de la población de células p63- $\alpha$ +, cabe mencionar que este marcador es específico para las células troncales epiteliales limbales, primero se realizó una selección de la población celular Figura VIIA, en donde se seleccionaron a las células nucleadas (círculo rojo) y se apartaron de los restos celulares. Después se hizo pasar un blanco (células sin marcador) con la finalidad de obtener un parámetro negativo (Figura VIIB), por ultimo se realizó un inmunomarcaje con el anticuerpo anti-p63- $\alpha$  (Santacruz, México) junto a su secundario FITC (Abcam, USA). Una vez identificadas a la región de las células negativas, todas las células que florecían son positivas al marcador que se estaba buscando (Figura VIIC, puntos mayores a  $10^1$ ), el citómetro conto un total de 50,000 eventos (células) de las cuales solo 2,903 son positivas para p63- $\alpha$  (esto es equivalente al 5.8% de la población total).



**Figura VIII.** Análisis por citometría de flujo. a) Se seleccionó a la población nucleada deseada indicadas en el círculo rojo, b) y c) Control negativo en donde se observa que no existe fluorescencia d) y e) Población de células positivas para el marcador p63- $\alpha$ , marcador específico de pluripotencia de las células troncales epiteliales limbales.