



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA (IOBA)

TESIS DOCTORAL

**Optimización de los cultivos de epitelio limbar humano
para su posterior trasplante a la superficie ocular**

**“Optimization of human limbal epithelial cultures for
clinical transplantation”**

Presentada por MARINA LÓPEZ PANIAGUA para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por

Dras. MARGARITA CALONGE CANO y TERESA NIETO MIGUEL

2013

FINANCIACION

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación concedida en convocatorias públicas competitivas de los siguientes proyectos de investigación:

- **Trasplante autólogo de células madre epiteliales limbares expandidas ex vivo para la reconstrucción de la ceguera corneal.** Plan de Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa aprobado por el Consejo de Ministros del 11 de octubre de 2007. Red de Terapia Celular (TerCel). Ministerio de Economía y competitividad. Instituto de Salud Carlos III. 2007-2008. IP: Dra. Margarita Calonge Cano.
- **Bioingeniería de Tejidos a Nivel Ocular: desarrollo de Complejos Células Madre Biopolímeros para la reconstrucción de la Superficie Ocular.** Junta de Castilla y León SAN673/VA/28/08. 2008-2009. IP: Dra. Rosa María Corrales Herrán.
- **Bioingeniería de Tejidos a Nivel Ocular: desarrollo de Complejos Células Madre Biopolímeros para la reconstrucción de la Superficie Ocular.** Junta de Castilla y León SAN/1778/2009. 2009-2011. IP: Dra. Margarita Calonge Cano.
- **“Bio-engineered stem cell niches (BioSCniche) in ocular surface reconstruction for corneal blindness: from basic research to clinical trials.”** Ministerio de Economía y competitividad, Instituto de Salud Carlos III. 2010-2011. IP: Dra. Margarita Calonge Cano
- **Medicina regenerativa con células madre corneales: optimización de las técnicas de cultivo para su traslación a la clínica humana.** Junta de Castilla y León SAN/103/2011/2011. 2011-2012. IP: Dra. Margarita Calonge.

A su vez, la realización de este trabajo de investigación ha recibido apoyo económico:

- **Centro de Investigación Biomédica en red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). N° Expte CB06/01/0003. Ministerio de Economía y competitividad. Instituto de Salud Carlos III.** Concesión al Grupo de Investigación en Superficie Ocular como grupo integrante. IP del Grupo IOBA en el CIBER-BBN: Margarita Calonge Cano. Duración: 03/08/2006-actualidad.
- **Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León. Área de Oftalmología.** Proyecto: Bioingeniería de Tejidos en la Superficie Ocular. Cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III y la Junta de Castilla y León. IP del grupo integrante: Margarita Calonge Cano. Duración: 2007-presente.

- **Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud: Red de Terapia Celular (TerCel).** Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III. IP del grupo integrante aceptado como “Grupo Clínico Asistencial”: Margarita Calonge Cano. Coordinador: Javier García Sancho, IBGM, Universidad de Valladolid. Duración: 05/12/2006-04/12/2012 Por otro lado, el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación personal recibida por parte de las siguientes instituciones:
- **12/2007-02/2008: Beca de Colaboración en Proyectos de Investigación. Universidad de Valladolid.** Actividad investigadora desarrollada en el Instituto de Oftamobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- **03/2008-02/2009: Beca de Iniciación a la Investigación. CIBER-BBN.** Actividad investigadora desarrollada en el Instituto de Oftamobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- **02/2009-05/2009: Beca de Investigación “Fundación Arroyo Villaverde”. Diputación Provincial de Palencia.** Actividad investigadora desarrollada en el Instituto de Oftamobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- **2009: Ayudas de bolsas de viaje para intervenciones en congresos científicos. Universidad de Valladolid.** Asistencia al “Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2009”. Fort Lauderdale (Florida, EEUU).
- **06/2009-06/2013: Ayudas destinadas destinadas a financiar la contratación de personal investigador de reciente titulación, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo tecnológico e Innovación 2007-2013, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo. Junta de Castilla y León, España. Ayudas concedidas para el desarrollo de tesis doctoral.** Actividad investigadora desarrollada en el Instituto de Oftamobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- **2012: Ayudas para estancias breves en el desarrollo de tesis doctorales. Universidad de Valladolid.** Estancia realizada en el “Institute of Ophthalmology (University College of London, UCL)” Departamento de Biología y Terapéutica Ocular. Londres, Reino Unido. Mayo – Agosto 2012.

PATENTES Y DIVULGACION CIENTIFICA

La presente tesis doctoral ha dado lugar a una solicitud de patente en la Oficina Española de Patentes y Marcas:

- Número de solicitud de patente española: **P201132081. Medio de cultivo celular útil para la proliferación in vitro de células del epitelio del limbo esclerocorneal.** Solicitantes: Universidad de Valladolid y Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Inventores: M. Calonge, T. Nieto-Miguel, RM. Corrales, **M. López-Paniagua**, A. de la Mata, S. Galindo.

Además, ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Corrales RM, Calonge M. Consecutive Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells from a Single Limbal Biopsy. *Current Eye Research*. 2013 May;38(5):537-549.
- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Corrales RM, Calonge M. Development of a biosafe cultura médium for in vitro consecutive limbal epithelail ste cell culture. Preparado para publicación en la revista "Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Parte del trabajo ha sido presentado en los siguientes reuniones científicas nacionales e internacionales:

- **Lopez M**, de la Mata, Galindo S, Saez V, Nieto T, Riera O, de la Paz MF, Herreras JM, Calonge M, Corrales RM. Biodegradable Polymers As Potential Carrier Substrates For Ocular Surface Reconstruction. Poster. 80th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, EEUU. 3-7 de Mayo de 2009. Publicación en: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: ARVO E-abstract 1787. (0146-0404).
- **López-Paniagua M**, de la Mata A, Galindo S, Nieto-Miguel T, de la Paz M, Corrales R, Calonge M. *Ex vivo* Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells (LESC). Poster. VI Edition IOBA's Day. Valladolid, España. 2009.
- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, De la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Calonge M. Optimization of Limbal Epithelial Stem Cells (LESCs) culture techniques for their translation to human clinical practice. Comunicación Oral. V Edition IOBA's Day. Valladolid, España. 2011.

- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Martínez-Osorio H, de la Paz MF, Corrales RM, Calonge M. DEvelopment of a Biosafe Culture Medium for in vitro Consecutive Limbal Epithelial Stem Cell Culture. Poster. Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2013). Del 17 al 20 de Junio de 2013. Estambul, Turquía.

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

Con esta tesis doctoral opta al grado de Doctor con Mención Internacional, por lo que ha sido organizada y desarrollada bajo las directrices del Comité de Doctorado Internacional de la Universidad de Valladolid. Se ha redactado un resumen en inglés del trabajo realizado, en el que se incluyen la justificación del trabajo realizado, así como los objetivos y la metodología desarrollados. Además, una amplia descripción de los resultados obtenidos y una exhaustiva discusión de los mismos han sido incluidos en dicho resumen.

Parte del tercer objetivo de esta tesis doctoral fue desarrollado en el Instituto de Oftalmología del "University of College of London (UCL)", durante una estancia (desde el 14 de Mayo hasta el 11 de Agosto de 2013) en el prestigioso grupo de investigación dirigido por la Prof. Julie T. Daniels. Durante dicha estancia se realizaron ensayos de clonogenicidad para detectar células madre funcionales en los cultivos primarios de limbo y microscopía electrónica de transmisión para analizar la ultraestructura celular. Este trabajo estuvo supervisado por la Dr. Hannah Levis y los resultados obtenidos permitieron la puesta a punto de ambas técnicas en la Universidad de Valladolid, así como la obtención de importantes resultados que forman parte de esta tesis doctoral. Además, se espera este trabajo de lugar a una publicación conjunta entre ambos grupos de investigación (UCL-Universidad de Valladolid) en una revista científica de alto impacto.

SUPPORT

Public funding:

- Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN) CB06/01/0003. Ocular Surface Group as member group. Institute of Health Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. From 03/08/2006 until present. PI: Margarita Calonge.
- Autologous transplantation of ex vivo expanded limbal epithelial stem cells for the restoration of corneal blindness. Institute of Health Carlos III, Spain. Cell Therapy Network. 30/12/2007-31/12/2008. PI: Margarita Calonge.
- Ocular tissue bioengineering: development of stem cell-biopolymers complexes for ocular surface reconstruction. Grant from Regional Government of Castile and Leon. SAN673/VA/28/08. 2008-2009. PI: Rosa M. Corrales.
- Ocular tissue bioengineering: development of stem cell-biopolymers complexes for ocular surface reconstruction. Grant from Regional Government of Castile and Leon. SAN_1778_2009. 2009-2011. PI: Margarita Calonge.
- Bio-engineered stem cell niches (BioSCNiche) in ocular surface reconstruction for corneal blindness: from basic research to clinical trials. Institute of Health Carlos III, Spain. 2010-2012. PI: Margarita Calonge.
- Regenerative medicine with corneal stem cells: optimization of cell culture techniques for their translation to the clinical practice. Grant from Regional Government of Castile and Leon. SAN/103/2011. 2011-2012. PI: Margarita Calonge.

Personal funding:

- 12/2007-02/2008: Project Collaboration Scholarship. University of Valladolid, Spain. Research activity developed at IOBA, University of Valladolid, Spain.
- 03/2008-02/2009: Research Initiation Scholarship. Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain. Research activity developed at IOBA, University of Valladolid, Spain.
- 02/2009-05/2009: Research Scholarship "Fundación Arroyo Villaverde". Diputación de Palencia, Spain. Research activity developed at IOBA, University of Valladolid, Spain.
- 2009: Travel grant (University of Valladolid), for the "Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2009", Fort Lauderdale (Florida, USA).
- 06/2009-05/2013: Predoctoral Training Program Scholarship of Castile and Leon Government and the European Social Funds, Spain. Research activity developed at IOBA, University of Valladolid, Spain.

- 2012: Travel grant (University of Valladolid), for research short-stay at the University College of London (UCL) - Institute of Ophthalmology, UK. From 14.05.2012 to 11.08.12.

PATENTS, PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC MEETINGS

Part of the work presented in this doctoral thesis was patented:

- 2011: Spanish patent application number P201132081. Cell culture medium for *in vitro* sclero-limbal epithelium proliferation. University of Valladolid and Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN). Inventors: Calonge M, Nieto-Miguel T, Corrales RM, **López-Paniagua M**, de la Mata A, Galindo S.

This work has been reported in part in the following publications:

- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Corrales RM, Calonge M. Consecutive Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells from a Single Limbal Biopsy. *Current Eye Research*. 2013 May;38(5):537-49.
- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Corrales RM, Calonge M. Development of a biosafe culture medium for *in vitro* consecutive limbal epithelial stem cell culture. Submitted for publication. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.

This work has been presented in part at the following scientific meetings:

- **Lopez M**, De la Mata A, Galindo S, Saez V, Nieto T, Riera O, de la Paz M, Herreras JM, Calonge M, Corrales RM. Repeated Expansion of Limbal Stem Cells From a Single Biopsy. Poster. 80th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, USA. 3rd – 7th of May, 2009. Publication: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: ARVO E-abstract 1787. (0146-0404).
- **López-Paniagua M**, de la Mata A, Galindo S, Nieto-Miguel T, de la Paz M, Corrales R, Calonge M. *Ex vivo* Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells (LESC). Poster. VI Edition IOBA's Day. Valladolid, Spain. 6th of November, 2009.
- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, De la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Calonge M. Optimization of Limbal Epithelial Stem Cells (LESCs) culture techniques for their translation to human clinical practice. Oral presentation. V Edition IOBA's Day. Valladolid, Spain. 2011. 25th of October, 2011.
- **López-Paniagua M**, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, Martínez-Osorio H, de la Paz MF, Corrales RM, Calonge M. Development of a Biosafe Culture Medium for *in vitro* Consecutive Limbal Epithelial Stem Cell Culture. Poster. Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2013). Istanbul, Turkey. 17th – 20th of June, 2013.

INTERNATIONALLY-AWARDED DOCTORAL DEGREE

This doctoral thesis applies for the Internationally-awarded Doctoral Degree. It has been organized at the University of Valladolid, under the regulations of the International Doctorate Committee. The joint requirements are as follows: a general summary in English, in which the thematic unit of the work is justified, and the objectives, methodology, results, discussion, and conclusions are presented.

Part of the third objective of this doctoral thesis was performed at the University College of London (UCL) - Institute of Ophthalmology. During my stay of three months in the research group of Dr. Julie T. Daniels (from 14.05.2012 to 11.08.2012), I worked under the supervision of Dr. Hannah Levis. We developed clonogenicity assays to detect functional limbal stem cells in limbal primary cultures and also conducted transmission electron microscopy experiments to examine the cell morphology of limbal primary cultures. The experiments were completed at the IOBA facilities and are part of this doctoral thesis. In this way, the thesis satisfies the requirements needed to apply for the International-awarded Doctorate Degree.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
1. Células madre y nichos de células madre.....	2
1.1. Concepto de célula madre y tipos	2
1.2. Concepto de nicho de células madre adultas y tipos.....	6
2. La superficie ocular	8
2.1. La córnea.....	9
2.2. El limbo y las células madre epitelailes limbares (CMEL).....	15
2.3. Comparación de la córnea y del limbo.....	22
2.4. Descripción del nicho de las CMEL	24
2.5. Regeneración del epitelio corneal.	27
3. Síndrome de insuficiencia límbica (SIL).....	28
3.1. Etiología.....	28
3.2. Signos y síntomas clínicos	29
3.3. Diagnóstico.....	30
3.4. Tratamientos.....	31
4. Trasplante de CMEL cultivadas <i>in vitro</i> y terapia celular.....	34
5. Limitaciones y controversias del trasplante de CMEL.....	35
5.1. Escasez de donaciones de tejidos limbares	35
5.2. Utilización de compuestos potencialmente nocivos en el cultivo de CMEL	36
5.3. Falta de consenso en el método de aislamiento de las CMEL del nicho limbar	37
JUSTIFICACIÓN	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Cultivo de líneas celulares inmortalizadas	46
1.1. Línea celular de epitelio corneal humano (<i>Human Corneal Epithelium</i> , HCE)	46
1.2. Línea celular de carcinoma de colon humano (HT29-MTX)	47
1.3. Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón albino (3T3/J2)	47
2. Procesado y fijado de tejidos humanos.....	48
3. Preparación de cultivos primarios	49
3.1. Cultivos primarios de epitelio limbar	49

3.2. Cultivos primarios de fibroblastos limbares	53
4. Análisis del rendimiento de los cultivos primarios de epitelio limbar	55
5. Análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica de contraste de fases ...	56
6. Análisis de la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica de transmisión	56
7. Tinción de ácido periódico de Schiff (<i>periodic acid-Schiff</i> , PAS)-hematoxilina.....	57
8. Análisis de expresión proteica por inmunofluorescencia	58
8.1. Preparación de muestras procedentes de tejidos humanos	58
8.2. Preparación de muestras procedentes de cultivos celulares	58
8.3. Técnica de inmunofluorescencia.....	59
9. Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa.....	61
9.1. Lisado celular de muestras procedentes tejido	61
9.2. Lisado celular de muestras procedentes de cultivos primarios	61
9.3. Extracción, homogeneización y purificación del ARNm	61
9.4. Cuantificación del ARN	62
9.5. Síntesis del ADN complementario (ADNc): retrotranscripción	63
9.6. Amplificación y cuantificación génica relativa mediante PCR a tiempo real.....	63
10. Ensayos de clonogenicidad celular.....	67
10.1. Análisis del número de unidades formadoras de colonias	67
10.2. Determinación de los tipos de colonias formadas: holoclones, meroclones y paraclones	68
11. Análisis estadístico	73
RESULTADOS	75
Validación de los diferentes marcadores utilizados	76
OBJETIVO 1.....	80
1.1. Características de los cultivos primarios de epitelio limbar.....	80
1.2. Caracterización de los CPLs consecutivos.....	82
OBJETIVO 2.....	90
2.1. Determinación de la composición de un medio de cultivo carente de componentes de origen animal y de compuestos potencialmente nocivos	90
2.2. Características de los CPLs obtenidos con los diferentes medios de cultivo.....	90
2.3. Caracterización de los CPLs obtenidos con los diferentes medios de cultivo	92

2.4. Expansión consecutiva de explantes limbares siguiendo el protocolo establecido en el objetivo 1 y utilizando el medio de cultivo IOBA-SH.....	99
2.5. Comparación de los CPLs consecutivos obtenidos con el medio IOBA-toxina colérica e IOBA-SH.....	105
2.6. Mejora de la composición del medio de cultivo IOBA-SH.....	106
OBJETIVO 3.....	114
3.1. Características de los cultivos primarios de epitelio limbar obtenidos a partir de diferentes técnicas de aislamiento celular.....	116
3.2. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares.....	119
3.3. Análisis funcional de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes y suspensiones celulares.....	124
DISCUSION.....	129
CONCLUSIONES.....	161
LIMITACIONES DEL TRABAJO Y	163
FUTURAS INVESTIGACIONES.....	163
ENGLISH SUMMARY	165
INTRODUCTION AND JUSTIFICATION	167
HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	175
METHODOLOGY.....	177
1. Cell line culture.....	178
1.1. Human corneal epithelial cell line	178
1.2. Colorectal adenocarcinoma cell line (HT29-MTX)	178
1.3. Mouse embryonic 3T3 fibroblast cell line (3T3/J2)	178
2. Human tissue preparation	178
3. Primary cultures	179
3.1. Limbal epithelial primary cultures	179
3.2. Limbal fibroblast primary cultures	181
4. Analysis of limbal epithelial primary cultures.....	181
5. Cell morphology under phase contrast microscopy.....	181
6. Cell morphology by transmission electron microscopy.....	181
7. Histology study.....	182
8. Immunofluorescence microscopy study	182
8.1. Samples from human tissues	182

8.2. Samples from cultures	182
8.3. Immunofluorescence microscopy protocol.....	183
9. Real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR)	184
9.1. Tissue and cell mRNA extraction	184
9.2. Real time RT-PCR	184
10. Clonogenicity assays	185
10.1. Colony forming efficiency	185
10.2. Clonal analysis	187
11. Statistical analysis	188
RESULTS	189
Validation of different markers used for cell characterization.....	190
OBJECTIVE 1	194
1.1. Consecutive LPC characteristics	194
1.2. Consecutive LPC characterization.....	196
OBJECTIVE 2	203
2.1. Description of a new modified culture medium, devoid of animal and any other potentially harmful supplements, for human use.....	203
2.2. Characteristics of LPCs obtained with the different culture media	203
2.3. Characterization of LPCs obtained with different culture media	205
2.4. Consecutive expansion of a single limbal explants using IOBA-HS culture medium 210	
OBJECTIVE 3	216
3.1. Characteristics of LPCs from explants and cell suspensions	216
3.2. Characterization of LPCs from explants and cell suspensions.....	218
3.3. Functional analysis of LPCs from explants and cell suspensions	223
DISCUSSION.....	227
CONCLUSIONS.....	243
BIBLIOGRAFIA/REFERENCES	245
ANEXO / ANEX I	261
ANEXO / ANEX II.....	264

INTRODUCCION

1. Células madre y nichos de células madre

1.1. Concepto de célula madre y tipos

Las células madre son células indiferenciadas, con capacidad de autorrenovación ilimitada y capaces de originar células hijas que se pueden diferenciar a distintos linajes celulares. Las células madre son las encargadas de mantener la homeostasis de los tejidos, mediante el reemplazamiento celular y la regeneración tisular, aunque solamente son una pequeña proporción del componente celular de los diferentes tejidos del organismo (Figura 1).¹

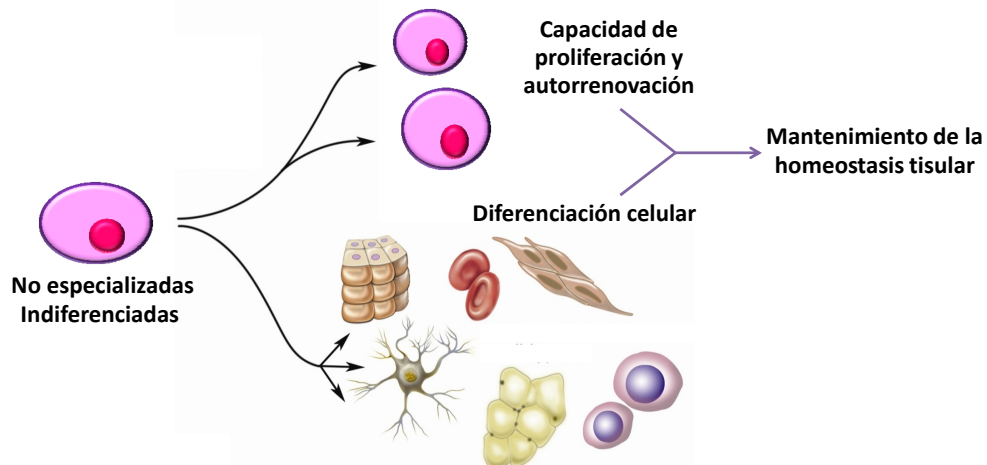


Figura 1. Características de las células madre. Las células madre se caracterizan por mantenerse indiferenciadas, autorrenovarse y originar células hijas capaces de diferenciarse a distintos linajes celulares, manteniendo la homeostasis celular. Imagen modificada de la original de Catherine Twomey, para *National Academies Understanding of Stem Cells: An overview of the Science and Issues*.

El hecho de que sean indiferenciadas que las células madre tengan un citoplasma poco complejo, con pocos orgánulos celulares. Estas células, además, tienen un ciclo celular largo, manteniendo su viabilidad durante largos periodos de tiempo.^{2,3} El tipo de división celular que presentan varía dependiendo del entorno en el se encuentran y las variaciones que se producen en el mismo. Pueden tener división asimétrica o simétrica⁴:

- **División asimétrica:** En este caso siempre se originan dos células hijas, una de ellas se diferencia hacia el linaje celular adecuado y la otra permanece indiferenciada manteniendo constante el número de células madre del tejido.
- **División simétrica:** A partir de una célula madre se originan dos células hijas con características de célula indiferenciada, por lo que esta función se concentra solamente en reponer la reserva de células indiferenciadas.

Tipos de célula madre según su potencial de diferenciación

Dependiendo del potencial de diferenciación que presentan, las células madre se pueden clasificar en cuatro tipos diferentes (Figura 2).⁵

- **Células madre totipotentes**, aquellas que poseen la capacidad de formar un embrión completo y, por tanto, de dar lugar a cualquier tipo celular e incluso tejidos extraembrionarios como la placenta, por lo que se considera al cigoto como la única célula madre totipotente.
- **Células madre pluripotentes** son aquellas que poseen la capacidad de dar lugar a cualquier tipo celular derivado de cualquiera de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).
- **Células madre multipotentes** son aquellas que pueden dar lugar únicamente a tipos celulares que formen tejidos de la misma capa embrionaria de la cual proceden.
- **Células madre unipotentes** son las más limitadas en cuanto a su capacidad de diferenciación, pudiendo diferenciarse únicamente a células del mismo tejido del cual proceden.

Si consideramos cada uno de los tipos como un nivel diferente (nivel 1: totipotentes, nivel 2: pluripotentes, nivel 3: multipotentes y nivel 4: unipotentes) se puede decir que dentro de cada nivel las células tienen capacidad de originar células del nivel siguiente, además de dar lugar a células del mismo nivel.

Tipos de células madre dependiendo de su origen

Por otro lado, las células madre pueden clasificarse según su origen en tres tipos diferentes:

- **Células embrionarias**. Estas son las células que componen la masa celular interna del blastocisto antes de su implantación. El blastocisto posee una capa de células (trofoblastos) externas que se originan la placenta y un conjunto de células en el interior, que son las células madre embrionarias propiamente dichas. Las células que componen esta masa celular tienen la capacidad de originar todos los tejidos del organismo, ya que son células madre pluripotenciales (revisado por⁶). El aislamiento de células embrionarias humanas se produjo en 1998 por Thomson et al, quien demostró que estas células son capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* manteniendo un estado indiferenciado, ya que mantenían la capacidad de diferenciarse a cualquier linaje celular en presencia de las señales adecuadas.^{7,8} El descubrimiento de este tipo celular permitió realizar importantes estudios en el campo del desarrollo embrionario precoz y en el campo de la diferenciación celular. Por

otro lado, estas células comenzaron a utilizarse en la creación de líneas celulares y además se comenzó a plantear el posible uso de las células madre embrionarias en la clínica humana. Sin embargo, su uso está en continua controversia por los problemas éticos que esto genera, estando regulado su uso de forma diferente en los distintos países.⁹

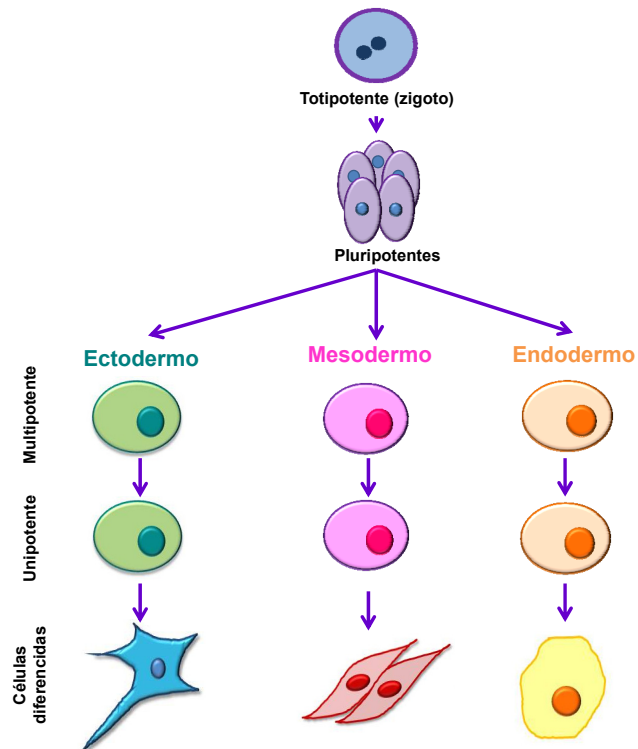


Figura 2. Clasificación de las células madre según su potencial de diferenciación. Se clasifican en cuatro "niveles": células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Cada una de ellas puede originar células del siguiente nivel, además de células de su propio nivel.

- **Células madre pluripotenciales inducidas.** Estas células son generalmente conocidas con las siglas iPSCs (*induced Pluripotent Stem Cells*) y son células madre conseguidas mediante reprogramación génica, induciendo en células somáticas adultas la expresión de genes exógenos capaces de des-diferenciarlas. Las células iPSCs son similares a las células madre embrionarias en su morfología y pluripotencialidad. Las iPSCs fueron producidas en 2006 por Takahashi y Yamanaka, reprogramando fibroblastos de ratón mediante la transfección de los genes Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc (propios de células madre embrionarias) utilizando retrovirus.¹⁰ Posteriormente, este procedimiento fue llevado a cabo en células somáticas humanas.^{11,12} El descubrimiento de las iPSCs abrió nuevos frentes de estudio en la biología básica, en el desarrollo de drogas y en la clínica humana. Sin embargo, esta técnica presenta aún bastantes limitaciones, como la posible aparición de mutagénesis en las células y la inducción de tumores. Recientemente se han desarrollado posibles soluciones para estas limitaciones, como el uso de vectores alternativos tales como adenovirus, plásmidos, trasposones o microARNs.^{13-15,16,17} Sin embargo, estas soluciones no son suficientes y, actualmente, se sigue investigando activamente en este campo.^{18,19}

- **Células madre adultas.** Son células indiferenciadas que se encuentran localizadas en cada uno de los tejidos que forman el organismo y cuya principal función es regenerar y mantener la homeostasis de dichos tejidos, reponiendo las células muertas por apoptosis o necrosis (revisado por ^{20,21}). Las características de estas células fueron descritas por primera vez en 1961, en células procedentes de la médula ósea.²²

Las células madre adultas se originan durante todo el periodo de la ontogénesis y permanecen en los diferentes órganos durante toda la vida del individuo, representado en cada uno de ellos un porcentaje muy bajo de la población celular total. Por ejemplo, en el intestino delgado, el 5% de la población celular son células madre adultas, mientras que en la médula ósea el porcentaje de este tipo celular es solamente del 0,01% (revisado por ²¹). Estas células pueden proceder de las tres capas embrionarias, encontrando así células madre adultas en la mayoría de los órganos procedentes del endodermo (pulmones, intestino, páncreas, hígado, mamas, ovarios y testículos), el mesodermo (médula ósea y corazón) y el ectodermo (cerebro y tejidos oculares, como el limbo, la conjuntiva y el cuerpo ciliar) (revisado por ²⁰).

Las células madre adultas están localizadas generalmente en lugares determinados dentro de los tejidos con un microambiente específico. Estos microambientes son lo que se denomina nichos. Aquí, las células madre adultas pueden permanecer quiescentes o activas, dependiendo de los requerimientos fisiológicos del tejido (revisado por ^{23,24}). Durante la fase celular activa se dividen de forma simétrica solamente cuando la renovación de la propia población de células indiferenciadas es necesaria, mientras que la división asimétrica se activa

como respuesta a ciertos estímulos, como la apoptosis celular, produciendo la regeneración de los tejidos. Cuando las células madre adultas se dividen por división asimétrica, la célula hija más diferenciada se denomina célula amplificada transitoria y se caracteriza por tener una elevada capacidad de proliferación y migración. Las células amplificadas transitorias son las que, tras un número limitado de divisiones, finalmente se diferencian hacia un linaje celular determinado (revisado por ^{20,21,24}). En raras ocasiones, cuando el tejido está sometido a un elevado estrés, las células madre adultas pueden dividirse de forma simétrica originando dos células amplificadas transitorias (revisado por ²¹).

Durante mucho tiempo se ha pensado que las células madre adultas solamente eran capaces de originar células hijas del mismo linaje celular. Sin embargo, se ha demostrado que también se pueden transdiferenciar, lo que conlleva que una célula madre adulta de un linaje tisular concreto puede convertirse en una célula de otro linaje celular, con diferentes características estructurales y funcionales (revisado por ²⁵). Actualmente se sabe que las células madre adultas pueden comportarse como células uni-, multi- o pluripotenciales (revisado por ²⁶). Estas características ponen de manifiesto la elevada plasticidad de este tipo celular (revisado por ²⁵).

Otra de las características más importantes de las células madre adultas es su capacidad para mantener un estado celular indiferenciado y generar células amplificadas transitorias en cultivo *in vitro* (revisado por ^{20,25,27}). Esta característica es la que ha determinado el posible uso de estas células en el campo de la medicina como terapia frente a diferentes patologías.

1.2. Concepto de nicho de células madre adultas y tipos

El nicho de las células madre es el microambiente en el que se encuentran dichas células dentro un tejido específico. Los nichos tienen una dimensión anatómica y funcional. Anatómicamente, están formados por un componente celular (células madres y otros tipos celulares), por un componente físico extracelular (matriz extracelular y, en muchos casos, membrana basal) y por un componente químico (factores secretados por las células). Son las interacciones entre estos tres componentes las que otorgan al nicho su funcionalidad. Existen evidencias que ponen de manifiesto que el nicho juega un papel importante en la regulación del número de células indiferenciadas, manteniendo el ambiente adecuado para asegurar la división asimétrica de las células madre, así como en la diferenciación y en la movilidad de las mismas.^{28,29} Recientemente, se ha propuesto la existencia de dos tipos de nichos, basándose en la estructura anatómica y en la hipótesis de que ejercen funciones diferentes sobre las células madre (Figura 3).²⁹

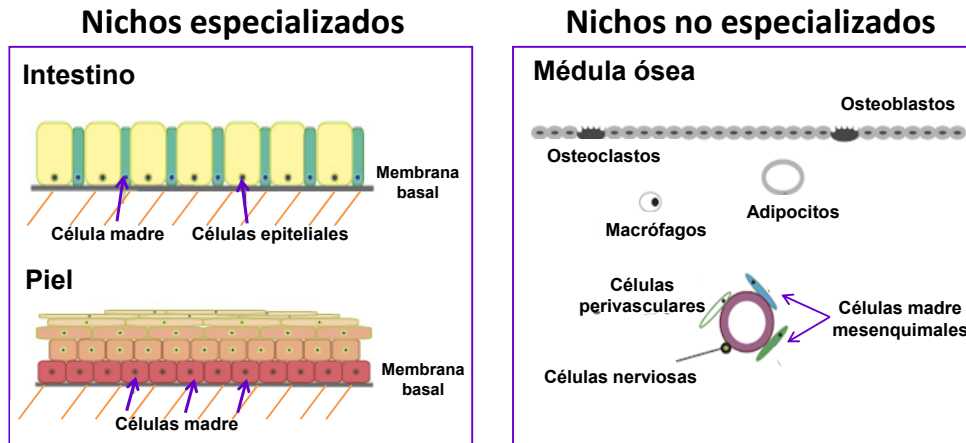


Figura 3. Tipos de nichos de células madre adultas. Los nichos especializados se caracterizan por tener una estructura organizada, compuesta generalmente por un epitelio que descansa sobre una membrana basal, debajo de la cual existe un estroma (representado con trazos naranjas en las imágenes). Las células madre se localizan en las capas más basales del epitelio. Los nichos no especializados no tienen una estructura organizada y están principalmente compuestos por células de origen mesodérmico, como los adipocitos, células del endotelio vascular, etc. Las células madre que generalmente se encuentran en estos nichos son las células madre mesenquimales. Imagen modificada de “Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. Blood 2012; 120:2174-2181”.

Por un lado, están **los nichos especializados**, que tienen una estructura determinada y organizada. Este tipo de nichos se suele localizar en los epitelios, donde las células madre se encuentran en las capas basales epiteliales, rodeadas de una o varias capas de células diferenciadas que ejercen diferentes funciones sobre ellas. El conjunto de las células madre y las células diferenciadas reside sobre una membrana basal, compuesta en la mayoría de los casos por laminina, colageno IV, perlecan y nodogen.³⁰ Se considera que esta membrana basal regula el ciclo celular y la polaridad celular. Debajo de la membrana basal existe una región estromal formada por matriz extracelular, vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y diferentes células estromales. Estos componentes se encargan de mantener la estructura del nicho y mantenerlo activo frente a diferentes estímulos, así como de ofrecer los nutrientes necesarios y la protección adecuada a las células madre. Se pueden encontrar nichos de este tipo en la epidermis, los testículos y la superficie ocular.²⁹

Por otro lado, están **los nichos no especializados**, caracterizados por una estructura desorganizada. Están compuestos por células diferenciadas de origen mesodérmico como fibroblastos, adipocitos, células del endotelio vascular y células de la sangre. El tipo de células madre adultas que suelen encontrarse en este tipo de nichos son células multipotentes o pluripotentes, como las células madre mesenquimales, que pueden viajar a diferentes regiones del organismo cuando las células madre adultas específicas de cada

tejido no son capaces de mantener la homeostasis tisular, generalmente porque el nicho en el que se encuentran está alterado. Además, se cree que cuando un nicho está dañado y no puede realizar su función, la estructura del mismo se modifica para poder albergar las células mesenquimales que migran hacia él, originando así un nicho no especializado. Un claro ejemplo de nicho no especializado es la médula ósea.²⁹

2. La superficie ocular

La superficie ocular está definida como una unidad anatómica, fisiológica, histológica y patológica que está constituida por la película lagrimal, por los epitelios que recubren las superficies palpebrales, la córnea, el limbo y la conjuntiva, así como por los tejidos conectivos subyacentes (Figura 4).^{31,32} Todos estos componentes forman un sistema de estructuras integradas con interdependencia entre ellas, que proporcionan funcionalidad a la superficie ocular. La función principal de la superficie ocular es permitir la visión manteniendo la transparencia corneal y protegiendo al globo ocular de los agentes externos tóxicos, infecciosos y traumáticos. Para cumplir ambas funciones, la superficie ocular debe mantenerse una integridad estructural, así como en continuo equilibrio fisiológico.³¹

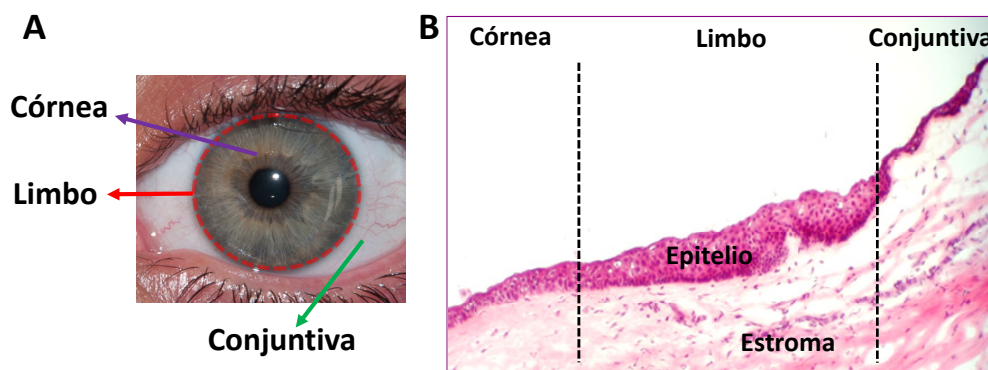


Figura 4. La superficie ocular. (A) Localización anatómica macroscópica de la conjuntiva, el limbo y la córnea. Histología de la superficie ocular. (B) Corte histológico transversal de la superficie ocular teñido con hematoxilina-eosina. El citoplasma y los núcleos celulares se pueden observar teñidos de fucsia y púrpura, respectivamente. Se muestran los epitelios de la córnea, del limbo y de la conjuntiva, así como el estroma de dichas estructuras. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA. 10X aumentos.

2.1. La córnea

2.1.1. Descripción macroscópica

La córnea es un tejido avascular, transparente y altamente innervado que está rodeado por fluidos: la película lagrimal por la zona anterior y el humor acuoso por la zona posterior. Representa una sexta parte de la circunferencia del ojo y estructuralmente consiste en una lente convexo-cóncava. Tiene forma de óvalo, siendo el diámetro horizontal (11,7 mm) mayor que el vertical (10,6 mm), refiriéndose estas medidas a la superficie corneal anterior. Sin embargo, debido a su curvatura, los diámetros de la superficie corneal posterior varían con respecto a los anteriores, siendo de aproximadamente 11,7 mm tanto en la zona horizontal como en la vertical (Figura 5).³³⁻³⁵ Existen también diferencias entre la córnea central y la córnea más periférica, reflejándose estas diferencias principalmente en el grosor y en la curvatura de la misma. De esta forma, la córnea central tiene un espesor de aproximadamente 500 μm y un radio de curvatura promedio de 7,8 mm, mientras que la córnea periférica tiene unos 650-700 μm de grosor y es menos curvada, con un radio de curvatura que oscila entre 6,2 y 6,8 mm (Figura 5).³⁶

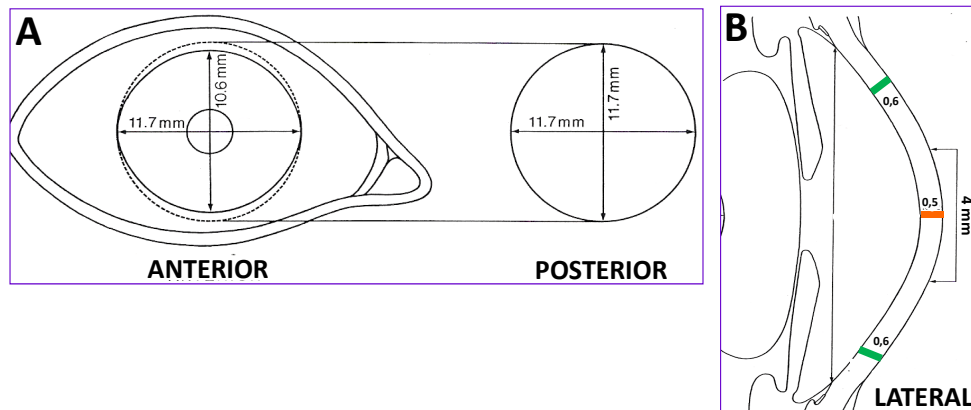


Figura 5. Estructura macroscópica de la córnea. (A) Medidas corneales desde una vista frontal. Diámetro corneal horizontal 11,7 mm y diámetro corneal vertical 10,6 mm. (B) Medidas corneales desde una vista lateral. (B) Se muestra el espesor corneal central (naranja) 0,5 mm y periférico (verde) 0,67 mm. (B) Se considera córnea central al círculo central de la córnea que tiene un diámetro de 4 mm.

2.1.2. Descripción microscópica y molecular

Histológicamente, en un corte transversal de la córnea se pueden distinguir cinco capas que desde la superficie anterior a la posterior son: el epitelio, la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio (Figura 6). Cada una de estas capas tiene a su vez una estructura determinada y cumple una función específica.

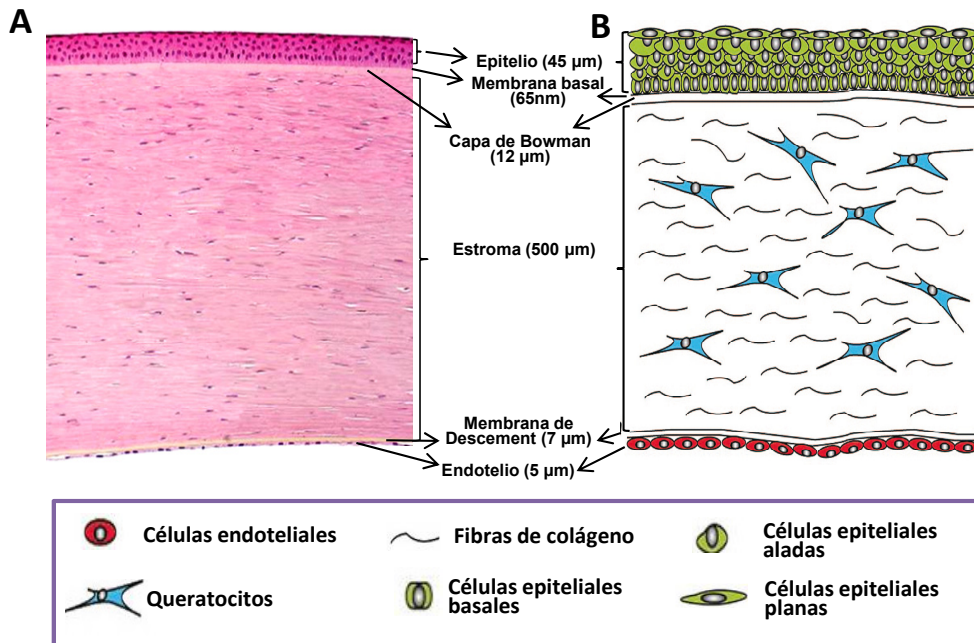


Figura 6. Estructura microscópica de la córnea. (A) Corte histológico transversal de la córnea, teñido con hematoxilina-eosina. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 10X aumentos. (B) Esquema general de un corte transversal corneal. Medidas de cada una de las capas que la componen. Tipos celulares presentes en cada región. Imagen modificada de "Secker G, Daniels J. Limbal epithelial stem cells of the cornea (June 30, 2009), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook,doi/10.3824/stembook.1.48.1, <http://www.stembook.org>."

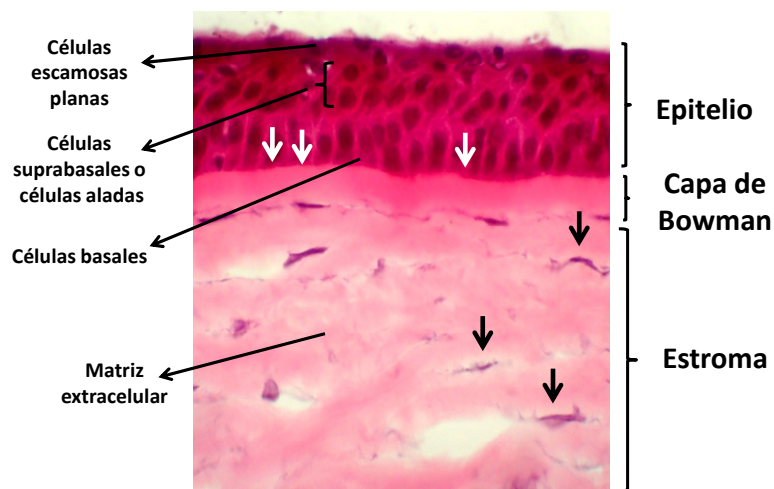


Figura 7. Epitelio-cap de Bowman-estroma corneal. Corte histológico transversal de la córnea central teñido con hematoxilina-eosina. Las flechas blancas indican la posición de la membrana basal y las flechas negras señalan fibroblastos del estroma corneal. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 40X aumentos.

Epitelio corneal

El epitelio corneal es un epitelio estratificado escamoso no queratinizado que está formado por 4-6 capas de células epiteliales en la zona central de la córnea, midiendo 45 µm de grosor, y por 8-10 capas en la zona más periférica, constituyendo aproximadamente el 10% del grosor total de la córnea (Figuras 6 y 7) (revisado por³⁷).

En el epitelio se encuentran tres tipos celulares diferentes. Las dos o tres capas más superficiales están compuestas por **células escamosas planas** unidas entre sí por uniones estrechas (*tight junctions*). Éstas confieren gran estabilidad al epitelio, permitiendo que resista a las presiones externas, proporcionándole la función de barrera anatómica al paso de sustancias al espacio intercelular.³⁸ Además, estas células tienen en su zona apical microvellosidades que aumentan la superficie de contacto con la lágrima y la retención de la misma en la superficie ocular. Las dos o tres capas intermedias del epitelio están formadas por **células suprabasales o células aladas**, que tienen finas extensiones y se unen entre sí mediante desmosomas y uniones estrechas. Estas células son las encargadas de reponer las capas más superficiales del epitelio cuando estas se pierden. Finalmente, en la zona más interna de epitelio se encuentran las **células basales**, formando una monocapa de células columnares unidas entre sí mediante desmosomas, uniones estrechas y uniones comunicante. Esta capa celular representa la capa germinativa del epitelio, ya que son las células únicas que pueden dividirse mediante mitosis, reponiendo las capas suprabasales. Además, estas células están unidas fuertemente mediante hemidesmosomas a la membrana basal sobre la que se sitúan, manteniendo a través de la misma la conexión del epitelio con el estroma.³⁹ Así mismo, estas células secretan componentes importantes de la matriz extracelular que regulan la función de la membrana basal y del estroma corneal.³⁹

Todos los tipos de células epiteliales expresan citoqueratinas (K), que constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto celular. La expresión de un tipo u otro puede indicar el grado de diferenciación celular.^{40,41} Las células epiteliales corneales se caracterizan por expresar una serie de K de manera específica que pueden ser utilizadas como marcadores para identificar este tipo celular. En concreto, el par de K3 y K12 está definido como específico de este tipo celular, por lo que estas dos proteínas han sido comúnmente utilizadas como marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas.^{42,43}

Está descrito que las células epiteliales corneales expresan proteínas de adhesión intercelular implicadas en las uniones estrechas, desmosomas o uniones comunicantes (uniones gap), como la E-cadherina, la conexina-43 y la desmoplaquina. Por otro lado, están presentes también proteínas que median la unión de las células epiteliales a la membrana basal, como las integrinas (revisado por^{44,45}). Las integrinas forman una familia de

receptores multifuncionales, compuestas por dos dominios extracelulares RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que interactúan con compuestos de la matriz extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular que se une a los componentes del citoesqueleto. Son las responsables de la unión célula-membrana basal e interactúan con receptores de factores de crecimiento, activando e inactivando cascadas intracelulares.^{46,47} Las células del epitelio corneal expresan las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 5$.^{44,45}

Por otro lado, entre los diferentes tipos de células epiteliales presentes en la córnea se encuentran otros tipos celulares como los linfocitos y las células dendríticas (Figura 6 y 7).^{48,49} En el epitelio corneal se pueden encontrar varios tipos de células dendríticas, que se distribuyen tanto por la córnea central como por la córnea periférica. Cada uno de estos tipos de células dendríticas cuenta con un patrón de expresión de marcadores diferente; sin embargo, la mayoría expresan la proteína CD11c, marcador que determina el linaje de las células dendríticas.^{48,49} Uno de los tipos de células dendríticas que aparecen en el epitelio corneal son las células de Langerhans, que además de expresar la proteína CD11c expresa de forma específica la proteína langerina.⁵⁰ Estas últimas sólo se localizan en la región corneal periférica.⁴⁹ La función de las células dendríticas en la córnea es mediar parte de la respuesta inmune, junto con los linfocitos, y la tolerancia de la superficie ocular, determinando la compatibilidad entre tejidos procedentes de diferentes individuos.⁴⁹

Membrana basal del epitelio corneal

La membrana basal es una región acelular situada inmediatamente por debajo del epitelio corneal (Figuras 6 y 7). Su grosor oscila entre 50 y 65 nm y está formada por fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos secretados principalmente por las células estromales, aunque parte de ellas proceden también de secreciones de la capa basal del epitelio corneal.³⁶ Las fibras de colágeno confieren a la membrana basal su arquitectura, encontrándose en esta región fibras de colágeno IV (específicamente la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV), V, VII, XVII y XVIII.^{51,52} Por otro lado, las glicoproteínas mantienen unidos los diferentes componentes de la membrana basal. En esta región, se puede encontrar glicoproteínas que se encuentran de forma rutinaria en la mayoría de membranas basales de la superficie ocular como la laminina, el nidógeno y la fibronectina, y otras que se encuentran de forma específica en la membrana basal de la córnea, como la fibrilina y la trombospondina 1. También proteoglicanos, como son el heparín y condroitín sulfato que, además de ejercer una función de unión entre los diferentes componentes, se encargan de regular el equilibrio hidroeléctrico.⁵¹

Capa de Bowman

Esta capa es una región acelular que mide entre 8 y 12 μm de espesor y que está situada debajo de la membrana basal del epitelio (Figuras 6 y 7).³⁶ Está formada principalmente por fibras de colágeno I y III, aunque también hay colágeno tipo V y VI.⁵² La función de esta membrana parece concentrarse en ofrecer resistencia frente a traumatismos ocasionados por la invasión de microorganismos y células tumorales.

Estroma corneal

El estroma corneal constituye el 90% del espesor de la córnea, midiendo aproximadamente 500 μm , siendo mayor en la cornea periférica que en la central.³⁶ Está compuesto por fibras de colágeno, matriz extracelular y células. El tipo de colágeno que predomina en el estroma corneal es el tipo I, aunque también hay colágeno tipo III, V y VI. Estas fibras tienen un diámetro que oscila entre 31 y 34 nm y se ordenan todas de forma paralela a la superficie, a una distancia entre ellas de 60 nm.⁵³ Esta organización es en buena parte responsable de la transparencia corneal, lo que permita que la luz se focalice en la retina.⁵⁴ En el espacio originado entre dichas fibras hay moléculas de colágeno tipo XII y proteoglicanos de tipo queratán y dermatán sulfato, también colocados de forma ordenada, que permiten la retención de agua en la estructura.⁵³

Finalmente, en el estroma existe un componente celular. El tipo celular que más prevalece en esta estructura son los queratocitos, aunque solamente constituyen entre el 3 y el 5% del volumen estromal total. Éstos son células muy alargadas, que se acoplan de forma paralela a las fibras de colágeno y que secretan la matriz extracelular que compone el estroma.³⁷ Los queratocitos expresan, entre otras, la proteína de adhesión celular CD34 y la enzima ALDH3A1 (aldehído deshidrogenasa 3A1), que protege a la córnea contra el estrés oxidativo inducido por la radiación ultravioleta tipo A (UVA), a través de una variedad de funciones biológicas, como el metabolismo de los aldehídos tóxicos, la generación de antioxidantes (NADPH), la absorción directa de los rayos UVA y la compactación de los especies reactivas del oxígeno, además de contribuir a las propiedades ópticas de la córnea.^{55,55,56} Estos expresan también la proteína transmembrana S100A4 o FSP1 (proteína específica de fibroblastos), molécula que participa en gran cantidad de procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la adhesión intercelular y, sobre todo, en los cambios de morfología celular, induciendo especialmente a las células hacia una morfología alargada.⁵⁷⁻
⁵⁹ Los queratocitos se caracterizan por permanecer quiescentes cuando la córnea está en un estado fisiológico normal. Cuando existe un traumatismo en el estroma corneal, estas células migran hacia el lugar de la lesión, diferenciándose a fibroblastos, con elevada motilidad y capacidad secretora de matriz extracelular, y finalmente a miofibroblastos, que además son capaces de contraerse. Ambos tipos celulares se encargan de reparar el daño corneal.^{60,61}

Recientemente, se ha descrito en ratones, que parte de los miofibroblastos que llevan a cabo esta reparación corneal proceden de la médula ósea.⁶² Los fibroblastos y miofibroblastos expresan determinados marcadores, que permiten diferenciarlos de los queratocitos, como la proteína VSX1 y la α -SMA, respectivamente.⁶⁰ Sin embargo, los tres tipos de células expresan la proteína S100A4, aunque la presencia de la misma es muy ligera en los queratocitos y mucho mayor en los fibroblastos y miofibroblastos. Este patrón de expresión proteica se ve modificado los queratocitos son cultivados in vitro con suero sanguíneo, condiciones en las que expresan gran cantidad de la proteína S100A4.⁶¹ Se ha descrito una población de queratocitos con características propias de células madre en la región anterior del estroma corneal.⁶³ Además, en el estroma se encuentran otros tipos celulares, como leucocitos y células plasmáticas. Al igual que en el epitelio corneal, existen también células dendríticas, aunque su presencia está limitada solamente a las zonas más cercanas al epitelio y no se ha descrito la presencia de células de Langerhans.⁴⁹ En contra a lo que sucede en el epitelio, en esta región hay macrófagos, células que no expresan la proteína CD11c pero que sí presentan la proteína CD11b.⁴⁹ Por otro lado, en el estroma corneal hay células nerviosas y alguna célula de Schwann, que se localizan en el tercio superior del estroma y otorgan a la superficie ocular una elevada sensibilidad a diferentes estímulos.

Membrana de Descemet

La membrana de Descemet es una capa acelular que mide entre 8-12 μm localizada justo por debajo del estroma, cuyos componentes son secretados por las células endoteliales.³⁶ Está formada principalmente por fibras de colágeno tipo IV, V y VI, aunque también hay glicoproteínas como la laminina y la fibronectina, que otorgan a la membrana de Descemet una elevada resistencia a traumatismos y reacciones inflamatorias (Figuras 6).⁵²

Endotelio

El endotelio corneal está formado por una monocapa de células hexagonales, que le confieren un espesor de 5 μm , unidas entre sí principalmente mediante desmosomas (Figuras 6 y 7).³⁶ Las células del endotelio corneal son de origen ectodérmico y se caracterizan por la expresión de proteínas de adhesión como las cadherinas, en concreto la VE-cadherina (cadherina del endotelio vascular, *vascular endothelial cadherin*, o CD144) y otros marcadores como la B4-lectina, ambas moléculas expresadas también por el endotelio vascular. Por el contrario, otras proteínas, como la proteína PECAM-1 (molécula de adhesión endotelial y plaquetaria o CD31) solo se expresa por células del endotelio vascular.^{64,65} Esta estructura celular desempeña una función vital en el mantenimiento de la turgencia de la córnea. En el nacimiento, la densidad celular del endotelio oscila entre 3500 y 4000 células/ mm^2 . Sin embargo, con la edad el número de células que forman el endotelio va disminuyendo, lo que puede afectar a sus funciones. Se considera que el endotelio humano

no tiene capacidad de regenerarse y que el espacio vacío generado por células muertas va siendo llenado por células ya existentes que aumentan su tamaño (revisado por³⁷). Sin embargo, estudios recientes proponen la capacidad de autorrenovación de las células del endotelio corneal en conejos, sobre todo en la córnea periférica.⁶⁶

2.1.3. Funciones generales de la córnea.

La córnea tiene dos funciones principales. Por un lado, su transparencia permite la transmisión de la luz, a la vez que su elevado poder de refracción ayuda a la focalización de la misma en el fondo del ojo para la posterior formación de la imagen. Y por otro lado, protege las estructuras intraoculares, formando una barrera química y mecánica entre el medio ambiente y el interior del globo ocular.

2.2. El limbo y las células madre epiteliales limbares (CMEL)

2.2.1. Descripción macroscópica

El limbo es la estructura de transición situada anatómicamente entre la córnea y la escleroconjuntiva.³⁶ Macroscópicamente, observando el globo ocular de frente, se puede identificar como un anillo de 1-2 mm de grosor de color oscuro que se encuentra rodeando la córnea transparente.⁵³ Debido a que el limbo rodea la córnea, la circunferencia que lo forma tiene un diámetro similar al diámetro anterior de la misma (Figura 8).

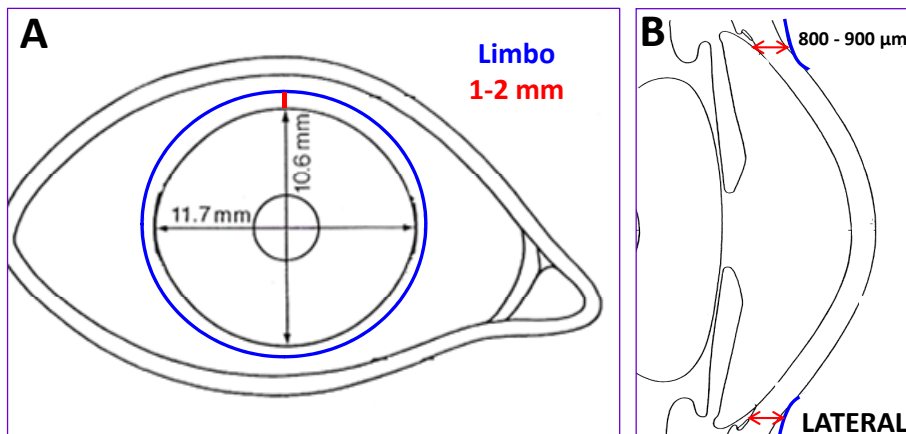


Figura 8. Estructura macroscópica del limbo. (A) Medidas del limbo desde una vista frontal. (B) Medidas limbares desde una vista lateral. El espesor limbar total es de aproximadamente 800-900 μm , alcanzando en algunas ocasiones 1mm.

2.2.2. Descripción microscópica y molecular

Histológicamente el limbo está formado por el epitelio limbar, la membrana basal y el estroma limbar (Figura 9).

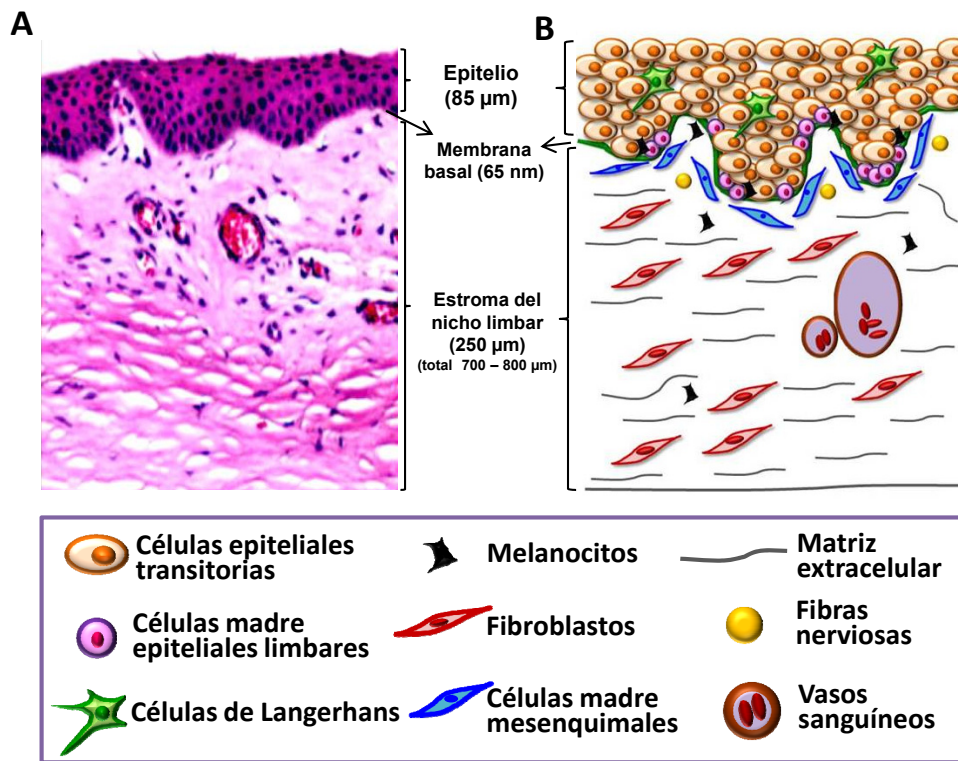


Figura 9. Estructura microscópica del limbo. (A) Corte histológico transversal del limbo, teñido con hematoxilina-eosina. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 20X aumentos. (B) Esquema general de un corte transversal limbar. Medidas de cada una de las capas que lo componen y tipos celulares presentes en cada región.

Epitelio limbar

El epitelio limbar está situado entre los epitelios de la córnea y de la conjuntiva, manteniendo ciertas características de ambos, pero adquiriendo también características propias. El epitelio limbar tiene un espesor de aproximadamente 85 μm y está formado por 10 capas celulares.³⁶ Las 2 o 3 capas más superficiales están formadas por células epiteliales en un estado de diferenciación avanzado, con un tamaño celular entre 10 - 20 μm . Las 6 o 7 capas intermedias están formadas por células epiteliales en un estado de diferenciación transitorio (células amplificadas transitorias) con un tamaño similar a las células que forman las capas más superficiales (Figura 10).⁴⁵ En estas capas intermedias, existen además otros tipos

celulares como células presentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas, entre las que se encuentran las células de Langerhans, al contrario que en el epitelio de la córnea central, donde estas últimas no están presentes,⁴⁹ y linfocitos T. La capa más interna del epitelio limbar está constituida por una monocapa celular, formada principalmente por células transitorias entre las que se intercalan células madre, que constituyen entre el 5 y 10% del total de las células del epitelio limbar.⁶⁷ Entre ellas están presentes también células de Langerhans, con características similares a las descritas en el epitelio corneal, linfocitos T y melanocitos.^{49,68,69} Los melanocitos tienen una morfología característica, en la que destacan sus prolongaciones citoplasmáticas denominadas dendritas y la presencia de gránulos de melanina. La melanina es el pigmento encargado de proteger a las células frente a las radiaciones UVA, sin embargo, la mayoría de las células no pueden sintetizar este componente. A través de sus dendritas, los melanocitos establecen contacto con las células epiteliales limbares que los rodean y mediante un mecanismo de exocitosis les transfieren gránulos de melanina agrupados en melanosomas.⁷⁰ En el limbo, un melanocito puede establecer contacto con, aproximadamente, 10 células epiteliales, y constituyen el 5% de las células limbares.⁷⁰ Se ha descrito, que los melanocitos establecen contacto con las células indiferenciadas del epitelio limbar y, parece ser, que las interacciones intercelulares se llevan a cabo por las cadherinas, moléculas de adhesión celular que se expresan en los melanocitos.^{71,72} Estas células se caracterizan también por expresar la proteína MART-1, descrita por primera vez en melanomas,⁷³ y la enzima tirosinasa,⁷⁰ exclusiva de melanocitos, que convierte la tirosina en melanina. Recientemente, se ha descrito que los melanocitos pueden ejercer un papel como células presentadoras de antígenos, llevando a cabo fagocitosis, y por lo tanto, formarían parte de la respuesta inmune.⁷⁴

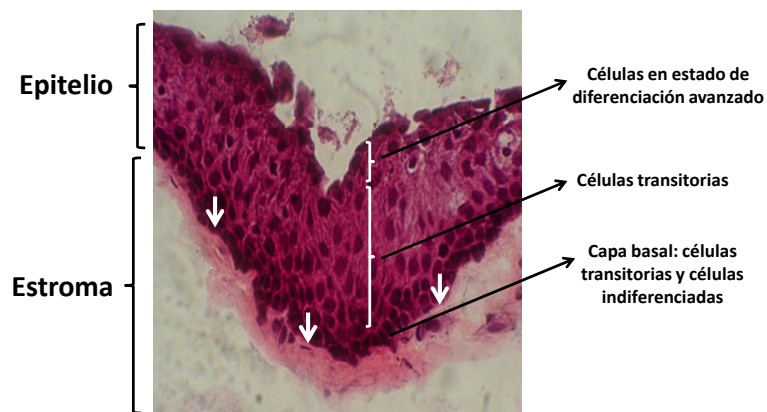


Figura 10. Epitelio-membrana basal-estroma limbar. Corte histológico transversal del limbo teñido con hematoxilina-eosina. Las flechas blancas indican la posición de la membrana basal. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 60X.

Células madre del epitelio limbar (CMEL)

La existencia de las CMEL se puso de manifiesto hace algunas décadas cuando se intentó cultivar *in vitro* células procedentes de los diferentes epitelios de la superficie ocular. Estos experimentos demostraron que las células epiteliales procedentes del limbo podían crecer *in vitro* sin problemas, mientras que las células procedentes del epitelio corneal apenas proliferaban.⁷⁵⁻⁷⁷ Este hecho, se relacionó con la hipótesis propuesta previamente en 1971 por Davanger y Evensen, quienes propusieron que el epitelio corneal estaba continuamente siendo renovado por una población celular residente en los “valles” del epitelio limbar.⁷⁸ Varios estudios posteriores, corroboraron la existencia de las CMEL.^{42,43,67,76}

Al igual que otras células madre adultas, las CMEL tienen un ciclo celular corto,⁶⁷ un elevado ratio núcleo/citoplasma y un citoplasma poco desarrollado, con escasa presencia de orgánulos. Se caracterizan por presentar una elevada concentración de heterocromatina en el núcleo y por tener división asimétrica. Estas células están unidas a la membrana basal mediante hemidesmosomas y, rodeándolas, se encuentran principalmente células transitorias que han incorporado en su citoplasma melanina (Figura 11).⁴⁵

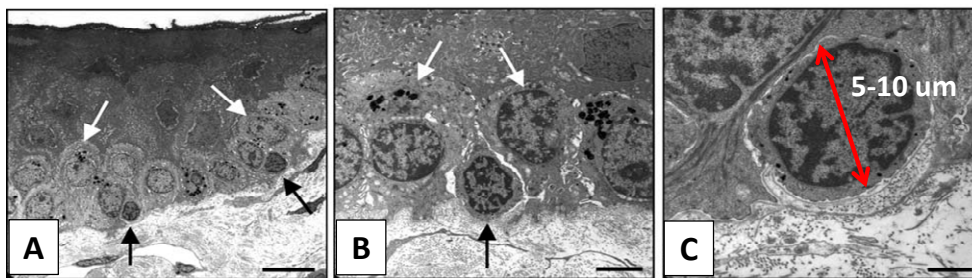


Figura 11. Células madre epiteliales limbares (CMEL). (A) Corte histológico de epitelio limbar observado con microscopio electrónico de transmisión. (B) Región del corte anterior donde se observan las células madre (flecha negra) con elevado ratio núcleo/citoplasma, elevada cantidad de heterocromatina, citoplasma con pocos orgánulos y apoyadas sobre la membrana basal. Las células transitorias que las rodean están marcadas con una flecha blanca. (C) Morfología de una CMEL. Imagen modificada de “Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005; 81:247-264”.

Las CMEL tienen un tamaño aproximado de 10 μm de diámetro (Figura 11C) y se caracterizan por tener mayor potencial de proliferación y potencial clonogénico que las células presentes en el epitelio corneal.⁷⁶ Otra de las características propias de estas células es la ausencia de moléculas específicas de células epiteliales corneales diferenciadas, como las K3 y K12.^{42,43}

Actualmente, no se conoce una combinación exacta de marcadores exclusivos de CMEL, aunque están descritos marcadores que aparecen de forma mayoritaria en el epitelio diferenciado de la córnea y otros que, por el contrario, aparecen mayoritariamente en las capas basales del epitelio limbar.

Al igual que las células diferenciadas del epitelio corneal, las CMEL expresan de forma mayoritaria algunas K, como la K14 y K15 que se expresan principalmente en las CMEL.⁷⁹ Otras moléculas que se expresan principalmente en estas células son la proteína ABCG2 (proteína de membrana transportadora de ATP, *ATP binding cassette sub-family G member 2*)⁸⁰ y el factor de transcripción p63.^{81,82} La proteína ABCG es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de los transportadores asociados a ATP. Es un factor que regula el transporte de moléculas implicadas en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular.⁸³ Además, esta proteína protege a las CMEL frente al estrés oxidativo inducido por toxinas.⁸⁴ Por otro lado, el marcador p63 es un factor de transcripción importante en el desarrollo epitelial.⁸⁵ Pellegrini et al. demostraron que este marcador se expresaba de forma mayoritaria en las capas basales del epitelio limbar y propusieron este marcador como propio de CMEL.⁸¹ Posteriormente, se describió la isoforma $\Delta Np63\alpha$ como marcador más específico de estas células.⁸² Al igual que las células del epitelio corneal, las CMEL también expresan integrinas. En estas células, se expresa de forma específica la integrina $\alpha 9$, además de otras integrinas que son expresadas también por las células corneales diferenciadas (Figura 12).^{44,45}

Recientemente, Pellegrini et al.,⁸⁶ siguiendo la metodología descrita por Barrandon y Green,⁸⁷ demostraron que las células basales del epitelio limbar tienen mayor capacidad de generar holoclonos (colonias de células en cultivo que proceden de células indiferenciadas) que las células del epitelio corneal. Actualmente, este es otro criterio utilizado para determinar la presencia de CMEL funcionales. Por otro lado, Majo et al. demostraron la presencia de células capaces de generar holoclonos en la zona del epitelio corneal, tanto en conejos como en cerdos, sugiriendo estos resultados la presencia de células madre no sólo en el epitelio limbar, sino también en el epitelio corneal. Sin embargo, esta teoría está todavía en profunda controversia.⁸⁸

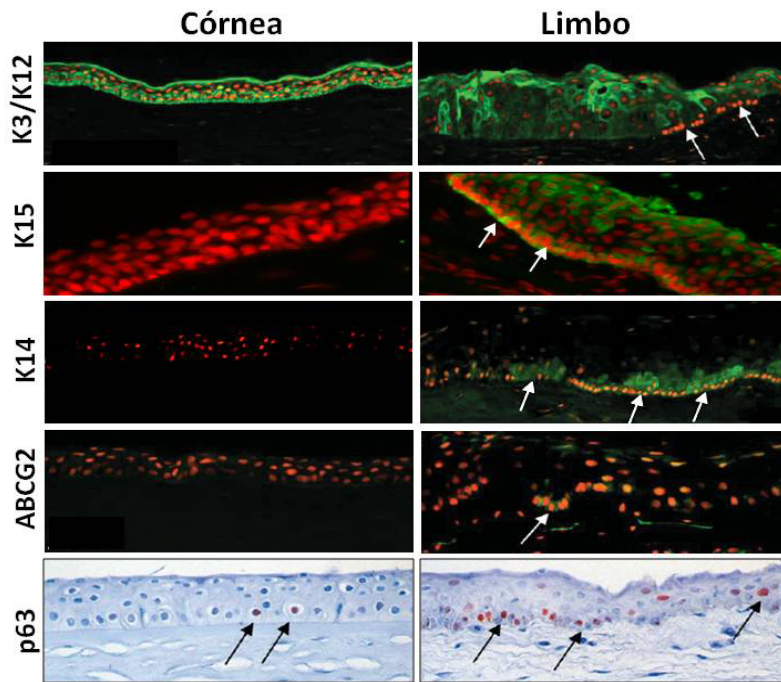


Figura 12. Expresión de diferentes marcadores en células epiteliales corneales diferenciadas y en células madre de epitelio limbar (CME). Las citoqueratinas (K) K3 y K12 no se expresan en las CME, mientras que K14, K15, ABCG2 y p63 se expresan de forma mayoritaria en estas células. Imágenes modificadas de "Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005; 81:247-264".

Membrana basal del limbar

La membrana basal es una capa acelular, de aproximadamente 65 nm de grosor, sobre la que reposan las células de la capa basal del epitelio (Figura 10). Al igual que la membrana basal de la córnea, está formada por fibras de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, aunque los tipos y la proporción de cada uno de ellos es diferente entre las dos estructuras. La membrana basal del limbo está formada por fibras de colágeno tipo IV, VII, XVI y XVII. A diferencia con la membrana basal de la córnea, en la del limbo no están presentes las cadenas $\alpha 3$ del colágeno tipo IV, sin embargo, sí que están presentes las cadenas tipo $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de este tipo de colágeno, inexistentes en la córnea. Otros de los principales componentes son las glicoproteínas, concretamente las laminina tipo 1 y 5 (cadenas $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 3$), la tenascina-C, la vitronectina y proteínas ácidas ricas en cisteína, que se expresan de forma específica en el limbo. Los proteoglicanos que se encuentran en esta región son la agrinina, el condroitín sulfato y el versican, todos ellos específicos de la membrana basal del limbo.⁵¹ Todos estos componentes, al igual que los componentes de las membranas basales de los diferentes epitelios, incluido el de la córnea, son secretados principalmente por las células epiteliales basales y una pequeña parte por las células estromales.

La membrana basal del limbo proporciona soporte al epitelio, ya que las células de la capa basal se anclan de forma sólida a la misma, actuando como barrera selectiva. Además, es capaz de regular muchas de las actividades metabólicas de las células que se sitúan sobre ella, como la proliferación, la diferenciación y la migración celular.⁸⁹ Se cree que estas funciones se llevan a cabo en gran parte por la transmisión de señales entre la matriz extracelular y el interior de las células, mediada por las integrinas.

Estroma limbar

El estroma limbar está formado por un componente celular y la matriz extracelular, secretada principalmente por las células estromales. El componente celular está principalmente constituido por fibroblastos que, en general, presentan características similares a los queratocitos del estroma corneal. Estos fibroblastos se caracterizan por secretar grandes cantidades de proteínas ácidas ricas en cisteína.⁹⁰ En el estroma limbar también se pueden encontrar otros tipos celulares, como los melanocitos (revisado por⁹¹). Además, recientemente se ha descrito la presencia de células derivadas de la médula ósea en el estroma corneal y limbar de ratones,⁹² así como la presencia de células madre mesenquimales en el estroma limbar humano, las cuales representan el 2% de las células estromales, localizándose en la región más cercana a la membrana basal.⁹³⁻⁹⁶ En cultivo *in vitro*, estas células muestran todas las características propias de las células mesenquimales establecidas por la Sociedad Internacional de Terapia celular⁹⁶ y se postula que podrían ser las encargadas de reemplazar los queratocitos corneales (revisado por⁹¹). Recientemente, Espana et al. demostraron que el estroma limbar tiene la capacidad de modular la diferenciación, la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales, haciendo que estas adquieran características típicas de células indiferenciadas, mientras que el estroma corneal promueve la diferenciación de las mismas, lo que demuestra que el estroma también juega un papel importante dentro del nicho limbar.⁹⁷

Por otro lado, al igual que la membrana basal, el componente no celular está formado por fibras de colágeno IV y VII. Además, también se encuentran en esta región moléculas de lamininas, nidógenos, fibrilina, proteínas ácidas ricas en cisteína, tenascina C y R y el proteoglicano versican, colaborando todas ellas en mantener la estructura del tejido limbar (Figura 9).⁵¹

El estroma limbar está altamente vascularizado para permitir el transporte de nutrientes y factores de crecimiento a esta región, además de altamente innervado,⁹⁸ para poder responder rápidamente a los diferentes estímulos.⁹⁹ La presencia de vasos sanguíneos determina también la presencia de células endoteliales vasculares. Estas, al contrario que las células endoteliales corneales, proceden del mesodermo y se caracterizan por expresar la

proteína PECAM-1 y el factor VIII (factor anti-hemofílico A), glicoproteína contenida en el plasma sanguíneo que actúa como uno de los cofactores de la cascada de la coagulación, cuyo precursor es sintetizado en el endotelio vascular.⁶⁴ Histológicamente, parte de los vasos sanguíneos están constituidos por fibras musculares, lo que determina la expresión de la proteína α -SMA en los vasos sanguíneos y, por lo tanto, en el estroma limbar.¹⁰⁰

2.3. Comparación de la córnea y del limbo

En este apartado, se resumen mediante dos Figuras (13 y 14) y una tabla (Tabla 1) las principales características macroscópicas y microscópicas de la córnea y el limbo.

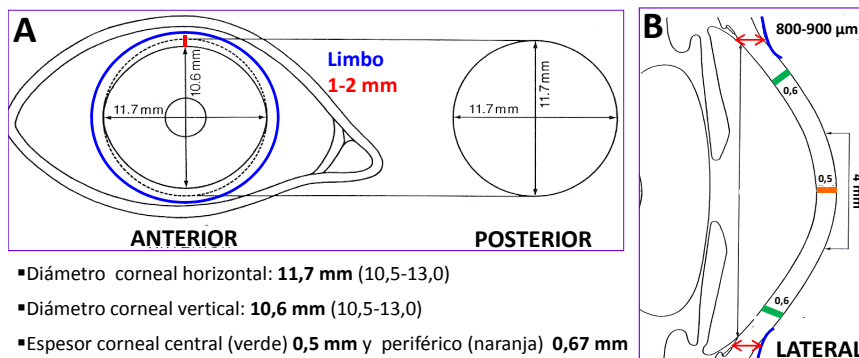


Figura 13. Estructura macroscópica de la córnea y del limbo. (A) Medidas corneales y limbares desde una vista frontal. (B) Medidas corneales y limbares desde una vista lateral.

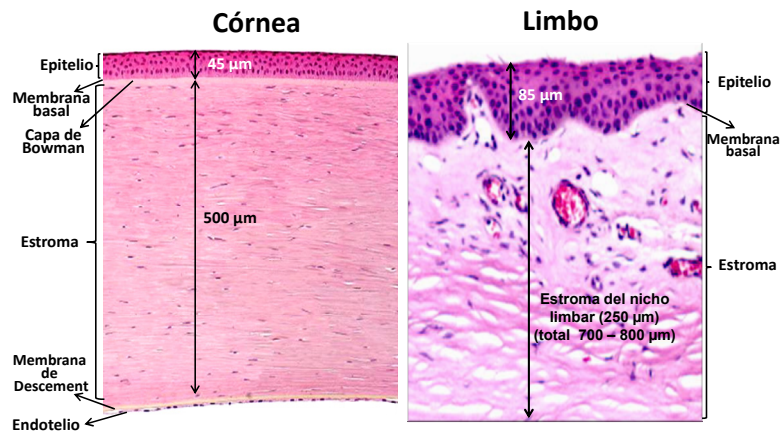


Figura 14. Estructura microscópica de la córnea y del limbo. Cortes histológicos transversales de la córnea y del limbo, teñidos con hematoxilina-eosina. Imágenes cedidas por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA.

Tabla 1. Tabla comparativa entre las principales características a nivel macroscópico, microscópico y molecular de la córnea y del limbo.

		Córnea	Limbo
Descripción macroscópica		<p>Tejido transparente situado en la zona anterior más externa del globo ocular.</p> <p>Lente cóncavo-convexa de 11,7 x 16,6 mm de diámetro.</p>	<p>Zona de transición pigmentada entre la córnea y la esclera-conjuntiva.</p> <p>Anillo de 1-2 mm de anchura y 11,7 mm de diámetro.</p>
Descripción microscópica	Histología	<p>Epitelio corneal (45 µm)</p> <p>Membrana basal (65 nm)</p> <p>Capa de Bowman</p> <p>Estroma (500 µm)</p> <p>Membrana de Descemet</p> <p>Endotelio</p>	<p>Epitelio limbar (85 µm)</p> <p>Membrana basal (65 nm)</p> <p>Estroma (250-450 µm)</p>
	Componente celular	<p>Epitelio: 5-7 capas de células epiteliales en la córnea central y 8-10 en la periférica: células escamosas, aladas y basales.</p> <p>Estroma: fibroblastos estromales o queratocitos.</p>	<p>Epitelio: 10 capas de células: células transitorias, células madre (5-10%), células de Langerhans, linfocitos T y melanocitos.</p> <p>Estroma: fibroblastos, células mesenquimales, melanocitos y células de Langerhans.</p>
Descripción molecular	Marcadores de células epiteliales	<p>+K3 -K14</p> <p>+K12 -K15</p> <p>+Dsp -ABCG2</p> <p>+Cnx-43 -p63</p>	<p>-K3 +K14</p> <p>-K12 +K15</p> <p>-Dsp +ABCG2</p> <p>-Cnx-43 +p63(ΔNp63α)</p>
	Membrana basal y estroma	<p>Colágeno I, III, IV (α3), VI, VII y XII</p> <p>Fibronectina</p> <p>Queratán sulfato</p> <p>Dermatán sulfato</p>	<p>Colágeno IV (α1 y α2)</p> <p>Laminina 1 y 5 (α2, β2, γ3)</p> <p>Fibronectina</p> <p>Osteonectina /Tenascina-C</p> <p>Condroitín sulfato</p>

		Córnea	Limbo
Descripción molecular	Marcadores de diferentes linajes celulares	<ul style="list-style-type: none"> +CD11c y langerina (células dendríticas y de Langerhans) + (macrófagos) +VE-cadherina y B4-Lectina (células endoteliales corneales) -PECAM y factor VIII (células endoteliales vasculares) -MART-1 y tirosina +S100A4 (queratocitos, fibroblastos y mioblastos) +αSMA (miofibroblastos) 	<ul style="list-style-type: none"> +CD11c y langerina (células dendríticas y de Langerhans) -CD11b (macrófagos) +VE-cadherina y B4-Lectina (células endoteliales vasculares) +PECAM y factor VIII (células endoteliales vasculares) +MART-1 y tirosina +S100A4 (queratocitos, fibroblastos y mioblastos) +αSMA (células de músculo liso de los vasos sanguíneos)

K3: citoqueratina 3, K12: citoqueratina 12, K14: citoqueratina 14, K15: citoqueratina 15, E-cad: E-cadherina, Dsp: desmoplaquina, Cnx-43: Conexina 43, ZO-1: zonula occludens 1, citoqueratina 14, ABCG2: proteína transportadora de ATP, p63: factor de transcripción nuclear p63, CD11c:integrina αX, CD11d:integrin αM, PECAM: molécula de adhesión endotelial, MART-1: antígeno asociado a melanoma, S100A4: proteína transmembrana S100A4, αSMA: α-actina de músculo liso.

2.4. Descripción del nicho de las CMEL

El limbo contiene unas estructuras en forma de empalizadas denominadas **empalizadas de Vogt** las cuales están formadas por valles de epitelio limbar que se intercalan con crestas de estroma limbar. Están orientadas radialmente y densamente concentradas en la parte superior e inferior del limbo. También hay empalizadas de Vogt, aunque en menor cantidad, en las regiones nasal y temporal. La distancia que existe desde una cresta a otra es de aproximadamente 40 μm y la profundidad de los valles es también de 40 μm. La longitud de una empalizada es bastante variable, desde 350 μm hasta 900 μm (Figura 15).^{99,101} Se ha observado que las células indiferencias del epitelio limbar están específicamente localizadas en el fondo de los valles de las empalizadas, ya que por su estructura y por la elevada concentración de melanocitos que se encuentran presentes en ellas, forman un microambiente de protección para dichas células. Las crestas estromales, así como el estroma localizado por debajo de los valles epiteliales, se caracterizan por estar altamente vascularizados e inervados, lo que favorece la llegada de nutrientes y factores de crecimiento a las células madre, así como una mayor protección mecánica. Además, la morfología en forma de empalizadas favorece la interacción epitelio-estroma considerablemente. De esta

forma, actualmente se considera a las empalizadas de Vogt como el nicho propiamente dicho de las CMEL y, por lo tanto, sería un nicho de tipo “especializado” (Figura 15).

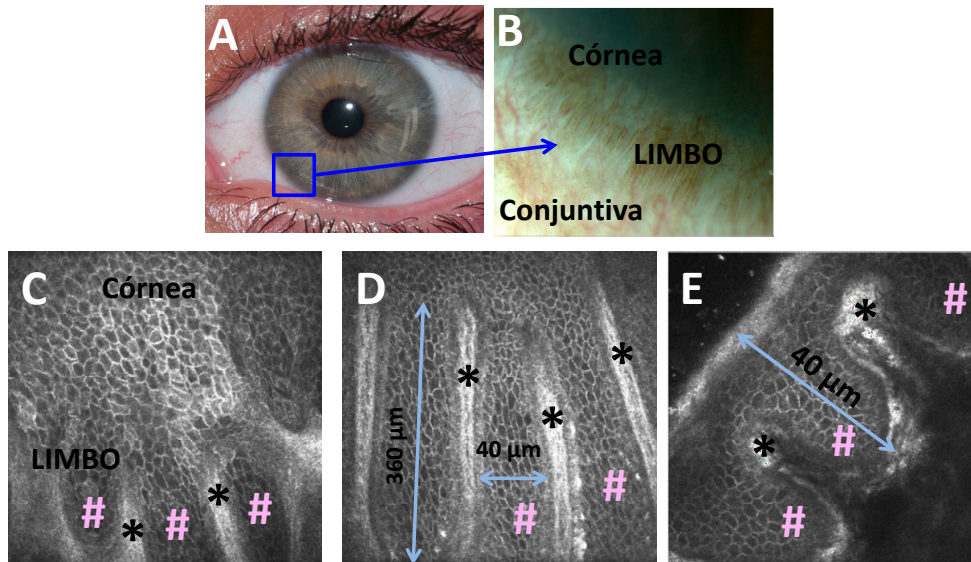


Figura 15. Empalizadas de Vogt. (A) Localización macroscópica de las empalizadas de Vogt. (B) Morfología de las empalizadas de Vogt cuando son visualizadas mediante lupa en una posición frontal. Las empalizadas de Vogt se reconocen por estar altamente pigmentadas debido a la elevada presencia de melanocitos. En la foto se observan como líneas marrones situadas entre la córnea y la esclera-conjuntiva. (C) Epitelio corneal y empalizadas de Vogt en una vista frontal realizada mediante microscopía confocal *in vivo*. Las células del epitelio corneal se ven como una estructura de celdas unidas entre sí. Cuando termina esta región se observa el limbo con las crestas (asteriscos negros) y los valles (almohadillas rosas) que forman las empalizadas de Vogt. (D) Empalizadas de Vogt en una vista frontal mediante microscopía confocal *in vivo*. (E) Empalizadas de Vogt en un corte transversal mediante microscopía confocal *in vivo*. Imágenes B, C y D cedidas por el grupo de investigación de superficie ocular del IOBA. Imagen E adaptada de la original del por Prof. C. Baudouin, MD, *National Ophthalmology Hospital Paris*, Francia.

Recientemente, se han descrito otras estructuras denominadas **criptas limbares**. Estas estructuras son prolongaciones del epitelio limbar que salen desde la zona más basal de los valles de las empalizadas de Vogt, que profundizan en el estroma limbar y que llegan a penetrar en el estroma conjuntival (Figura 16). El estroma que rodea estas estructuras es también altamente vascularizado y contiene una elevada carga celular. Al igual que las empalizadas de Vogt, las criptas limbares están más concentradas en las regiones superior e inferior del limbo y se consideran un nicho de células indiferenciadas todavía más especializado que las empalizadas de Vogt.^{102,103} Otras estructuras descritas recientemente que aumentan la especialización de las empalizadas de Vogt como nicho limbar son las

proyecciones estromales focales, prolongaciones del estroma que llevan un vaso sanguíneo central y que se adentran en el epitelio corneo-limbar de las regiones de los valles de las empalizadas (Figura 16). Al igual que las empalizadas de Vogt y que las criptas limbares, se encuentran con más frecuencia en la zona superior e inferior del limbo.¹⁰³

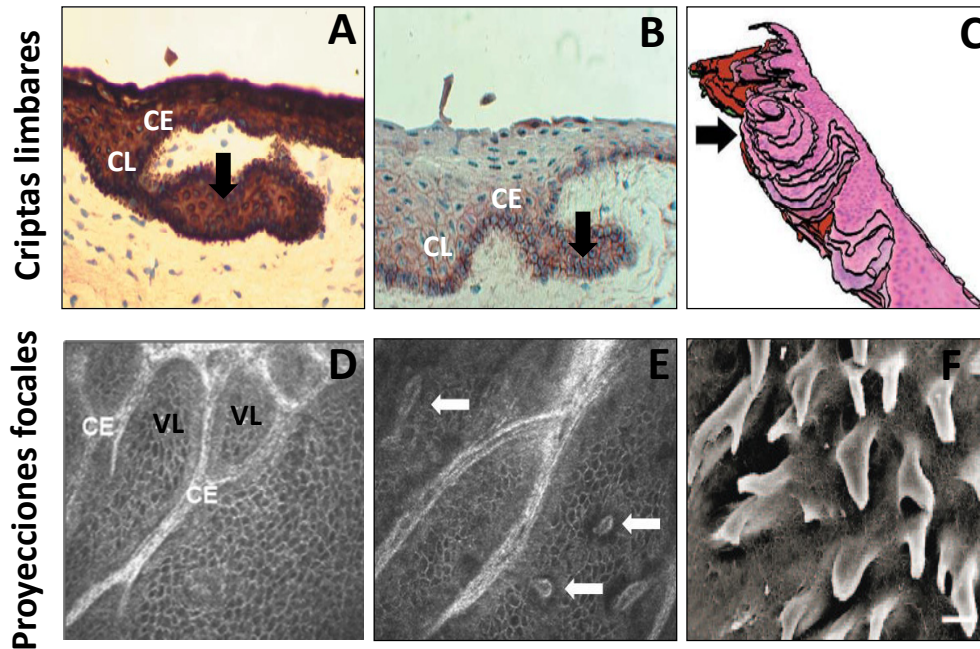


Figura 16. Criptas limbares y proyecciones estromales focales. Inmunohistoquímica de la (A) citoqueratina 14 y (B) la proteína ABCG2, ambos marcadores de células indiferenciadas, en un corte histológico transversal del limbo. Se observan las crestas (CE) y valles limbares (VL) que forman las empalizadas Vogt. Las criptas limbares están marcadas con una flecha negra. (C) Esquema tridimensional de una cripta limbar. (D) Crestas y valles limbares en las empalizadas de Vogt visualizadas mediante microscopía confocal in vivo en un plano frontal. (E) A más aumentos se observan las proyecciones estromales focales, también en un plano frontal. (F) Proyecciones estromales focales adentrándose en el epitelio de un valle de las empalizadas de Vogt visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido. Imágenes A, B y C modificadas de "Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. Br J Ophthalmol 2005; 89:529-532." Imágenes D y E cedidas por el grupo de investigación de superficie ocular del IOBA. Imagen F modificada de "Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. 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; 25:1402-1409".

2.5. Regeneración del epitelio corneal.

La principal función de las CMEL es la renovación constante del epitelio corneal.⁷⁸ En 1983, Thoft y Friend establecieron la “hipótesis X,Y,Z”, que explica la renovación del epitelio corneal por medio de tres ejes: el eje X, que consiste en la proliferación de las células basales, el eje Y, que representa en la proliferación y migración centripeta de las células limbares hacia la córnea y el eje Z, que se traduce en la pérdida de las células epiteliales de la superficie del epitelio corneal. En definitiva, las células que se pierden de la capa superficial del epitelio corneal (eje Z) son directamente reemplazadas por las células basales del epitelio que están dividiéndose (eje X) y estas, a su vez, por células del epitelio limbar, donde cada CMEL se divide de forma asimétrica originando dos células hijas: una de ellas permanece de forma indiferenciada formando parte del epitelio limbar basal mientras que la otra comienza a migrar hacia el epitelio corneal a la vez que sufre un proceso de diferenciación, llegando a las zonas medias del epitelio corneal totalmente diferenciada (eje Y).¹⁰⁴ De esta forma, se mantiene la constante homeostasis del epitelio corneal (Figura 17). Esta hipótesis dejó de ser tal y se convirtió en un hecho científico cuando, posteriormente,^{42,43,67,76} se definió el limbo esclero-corneal como el nicho de las células madre capaces de regenerar la córnea, es decir, de las CMELs.

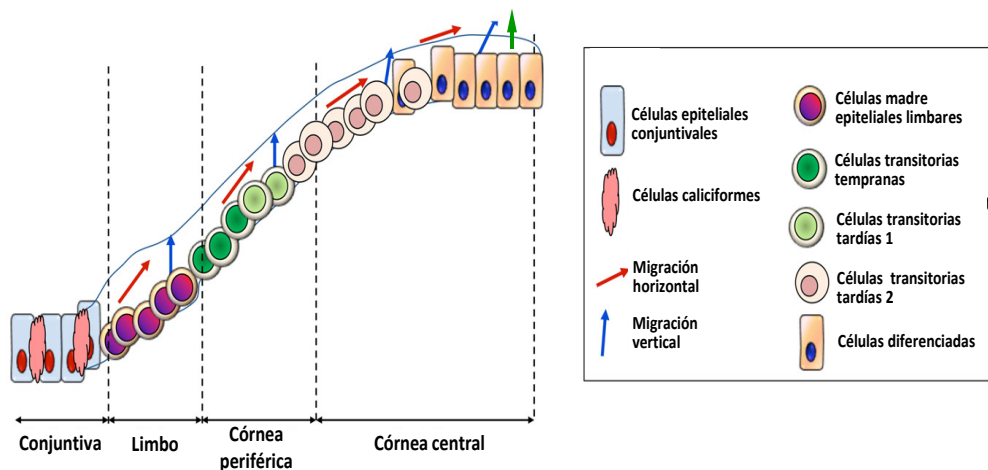


Figura 17. Renovación del epitelio corneal, hipótesis X, Y, Z. Las células que se pierden de la capa superficial del epitelio corneal (eje Z, flecha verde) son directamente reemplazadas por las células epiteliales de las capas basales que están proliferando (eje X, flechas rojas) y éstas, a su vez, por células que proceden del epitelio limbar (eje Y, flechas azules). Imagen modificada de “Ahmad S, Kolli S, Lako M, Figueiredo F, Daniels JT. Stem cell therapies for ocular surface disease. Drug Discov Today 2010; 15:306-313”.

3. Síndrome de insuficiencia límbica (SIL)

Se denomina SIL a la entidad clínica producida como consecuencia de la destrucción parcial o total de las CMEL y/o de su nicho, y que impide la regeneración del epitelio corneal.¹⁰⁵

3.1. Etiología

El SIL puede estar originado por causas primarias o secundarias (Figura 18) (revisado por^{105,106}):

- Las causas primarias están relacionadas con enfermedades genéticas que desembocan en un nicho limbar insuficiente, como el que se origina en los casos de aniridia, eritroqueratodermia congénita, queratitis asociadas a deficiencias endocrinas y queratopatías neurotróficas. Estas causas son las menos frecuentes.

- Las causas secundarias están relacionadas con factores externos y enfermedades del sistema inmune que afectan directamente a la integridad de las CMEL. En este grupo podemos encontrar las quemaduras químicas, el Síndrome de Stevens-Johnson, el penfigoide de las membranas mucosas, las cirugías o las crioterapias, el uso abusivo de lentes de contacto, las infecciones bacterianas muy severas, etc. Estas causas son las más frecuentes.

Por otro lado, el SIL puede ser unilateral o bilateral, afectando a un solo ojo o a ambos, y total o parcial, afectando a la totalidad del anillo limbar (360°) o solo a una región del mismo. En ocasiones, las células madre de la conjuntiva también pueden estar afectadas, produciéndose entonces una queratinización total de la superficie ocular. Esto puede ocurrir cuando la causa del SIL es el Síndrome de Stevens-Johnson o un penfigoide de las membranas mucosas.^{107,108}

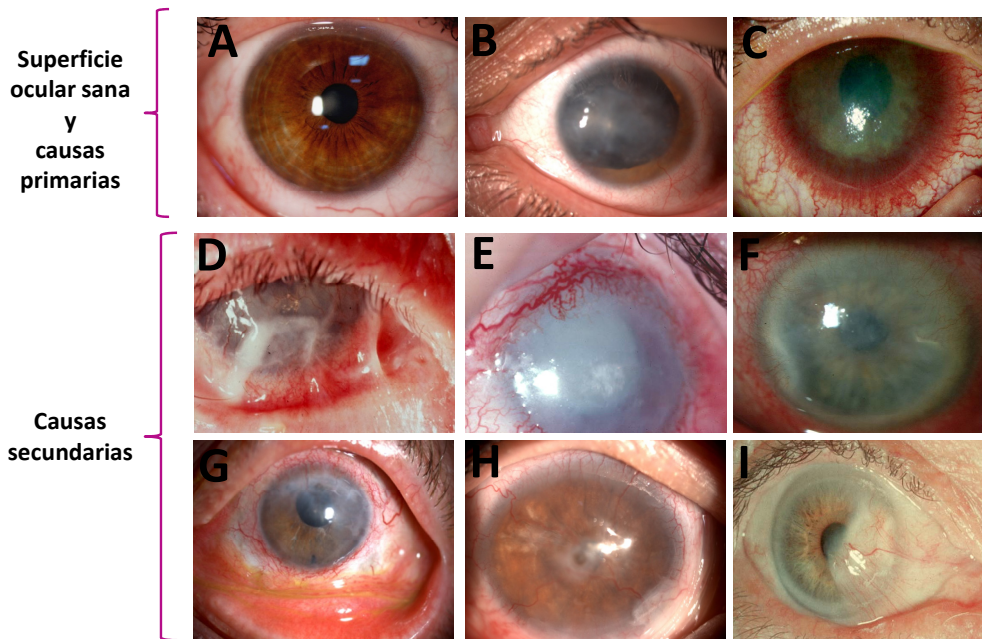


Figura 18. Ejemplos de casos de síndrome de insuficiencia límbica. (A) Superficie ocular sana. (B) Superficie ocular afectada por aniridia congénita, (C) displasia ectodérmica, (D) Penfigoide de las membranas mucosas, (E) causticación química, (F) infección microbiana severa, (G) uso abusivo de lentes de contacto, (H) Síndrome de Stevens Johnson y (I) pterigium.

3.2. Signos y síntomas clínicos

El SIL se caracteriza por la presencia de epitelio conjuntival cubriendo la córnea, ya que en estos casos, el limbo no es capaz de regenerar el epitelio corneal y es la conjuntiva la que reepiteliza esta región, originando así el fenómeno conocido como conjuntivalización o pannus. Por ello, es común que aparezcan neovasos superficiales en la córnea (neovascularización), que en su estado normal se presenta como un tejido avascular. A estos signos clínicos van también asociados los derivados del fracaso del epitelio, como la erosión, la formación de úlceras persistentes, la destrucción de la membrana basal, la destrucción de las empalizadas de Vogt, con el consecuente crecimiento de tejido conjuntival, y una córnea de grosor variable. En último término, el SIL puede producir una inflamación persistente y una opacificación de la parte anterior de la córnea. Esto puede desencadenar un conjunto de síntomas clínicos importantes, como la pérdida parcial o completa de la visión, fotofobia, lagrimeo y blefarospasmo, además de un síndrome de dolor crónico y una disminución notable en la calidad de vida (revisado por ^{105,109}).

3.3. Diagnóstico

El diagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo principalmente mediante la evaluación de varios de los signos clínicos mencionados anteriormente. Todos ellos pueden ser detectados mediante simple observación del paciente, pero necesitan ser posteriormente confirmados por diferentes pruebas diagnósticas. El defecto epitelial es confirmado mediante el uso de la tinción con fluoresceína, un colorante que penetra fácilmente en el epitelio conjuntival, mientras que no puede hacerlo en el epitelio corneal, ya que éste último es mucho más impermeable.^{110,111} De esta forma, las regiones que tiene un epitelio corneal intacto no se tiñen con el colorante, mientras que las regiones cubiertas por epitelio conjuntival o desepitelizadas quedan teñidas por la fluoresceína. Por otro lado, la conjuntivalización puede ser verificada por un análisis celular mediante citología de impresión corneal. Cuando la población celular obtenida en la citología presenta células caliciformes, propias del epitelio conjuntival y que no se encuentran en el epitelio corneal, se considera que la superficie ocular está afectada por SIL.^{112,113} Finalmente, la desorganización física de las empalizadas de Vogt, así como los cambios producidos en el epitelio corneal, pueden ser contrastados mediante la realización de microscopía confocal *in vivo*, método no invasivo de contacto que permite obtener imágenes con calidad similar a un corte histológico de tejidos.¹¹⁴ Esta tecnología se está empezando a utilizar de forma más rutinaria en este campo, debido a las nuevas publicaciones que relacionan la pérdida de la integridad histológica de las diferentes estructuras de la superficie ocular, principalmente córnea y limbo, con los diferentes síntomas clínicos (Figuras 19 y 20).¹¹⁵

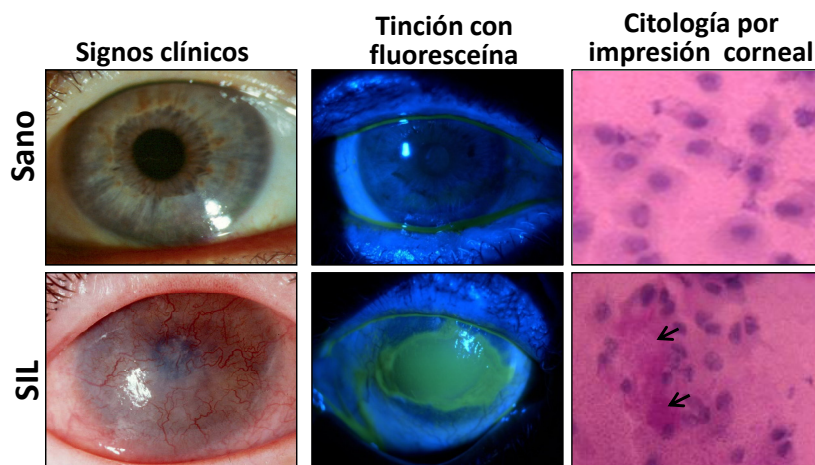


Figura 19. Técnicas de diagnóstico para el síndrome de insuficiencia límbica (SIL). Como signos clínicos se pueden observar la opacificación, la conjuntivalización y la neovascularización corneal de la superficie ocular afectada por SIL, además de observar regiones de la córnea teñidas con fluoresceína (amarillo verdoso) que indican el defecto epitelial. Las células caliciformes se observan en morado intenso en la citología por impresión corneal obtenida de pacientes con SIL. Imágenes de citología de impresión cedidas por el laboratorio de Patología ocular del IOBA. El resto de las imágenes fueron cedidas por grupo de investigación de superficie ocular del IOBA.

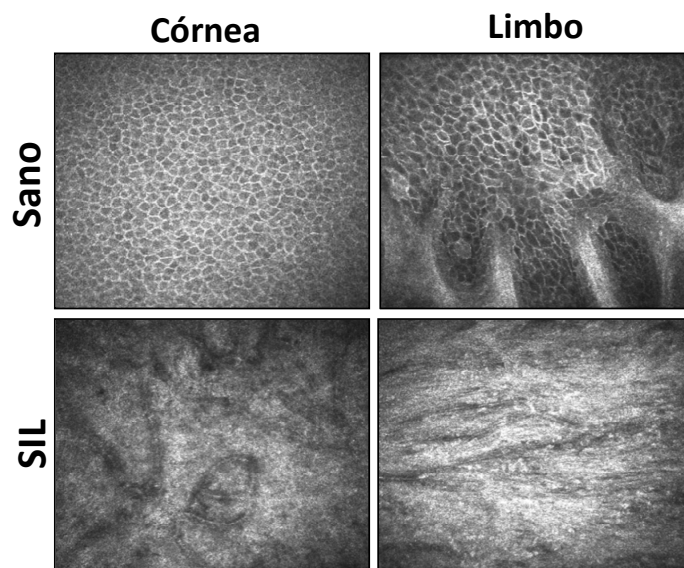


Figura 20. Técnica de microscopía confocal in vivo para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límica (SIL). Se observa la desorganización del epitelio corneal y la destrucción de las empalizadas de Vogt en los ojos enfermos. Imágenes cedidas por el grupo de investigación de superficie ocular del IOBA.

3.4. Tratamientos

Desde que el SIL se identificó como una patología de la superficie ocular se han desarrollado diferentes técnicas quirúrgicas para su tratamiento, entre las que se encuentran la queratoplastia penetrante, el trasplante de membrana amniótica, el trasplante de tejido limbar y, más recientemente, el trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro*, entre las que se encuentran las CMEL. Por supuesto, todas estas opciones quirúrgicas se ofrecen al paciente después de haber realizado un exhaustivo tratamiento médico.

La queratoplastia (trasplante de córnea) penetrante es una técnica quirúrgica que consiste en extirpar el botón corneal en el receptor y sustituirlo por el botón corneal sano de un donante cadáver (trasplante alogénico). La queratoplastia es indispensable para reconstruir el daño estromal severo, pero solo estimula la reepitelización corneal en el caso de que existan todavía en la superficie ocular CMEL sanas y funcionales. Por ello, esta técnica solo tiene éxito en un número muy bajo de los casos afectados con SIL, en los que el daño de la región limbar es mínimo, es decir, en casos de SIL parcial leve. En la mayoría de los casos de SIL considerados graves, esta terapia por sí sola está condenada al fracaso y es necesario aportar, de forma previa al trasplante corneal, una fuente de CMELs que sean capaces de mantener la regeneración del epitelio de la nueva cornea trasplantada.

Otro tratamiento que se ha aplicado especialmente en los casos de SIL parcial es el trasplante de membrana amniótica a la superficie ocular, realizado por primera vez en 1998 por Tseng *et al.*¹¹⁶ La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta y está constituida por un epitelio en monocapa, una membrana basal y un estroma.¹¹⁷ Se ha demostrado que la membrana amniótica trasplantada sobre la superficie ocular estimula la migración y adhesión de las células epiteliales, disminuye la inflamación (acción antiinflamatoria), la neovascularización (acción antiangiogénica) y la fibrosis.^{118,119} Además, tiene acción antimicrobiana y presenta baja inmunogenicidad.¹²⁰ Este tipo de trasplantes produce una mejora clínica en los pacientes debido sobre todo a la disminución de la fotofobia y del dolor, ayudando a restaurar una superficie epitelial corneal asintomática.^{118,121} De esta forma, la membrana amniótica mejora el estado de la superficie ocular en algunos casos de SIL parcial.¹¹⁶ Sin embargo, esta terapia tampoco es capaz de reponer la falta de CMEI en los pacientes afectados por SIL, ya que proporciona principalmente un alivio sintomático.

En definitiva, en muchos de los casos diagnosticados como de SIL parcial y en todos los SIL completos, estos tratamientos están condenados al fracaso y es necesario aportar una fuente de células madre como tratamiento.

La primera técnica empleada para afrontar estas limitaciones fue el trasplante de tejido limbar. Esta técnica fue desarrollada por Kenyon y Tseng en 1989 y demostró el éxito de la utilización del tejido limbar como fuente de células madre en la regeneración de la población celular destruida. Sin embargo, esta técnica presenta varias inconvenientes.^{122,123} El trasplante de tejido limbar en casos de SIL unilateral en el que el tejido donante procede del ojo contralateral del propio paciente (trasplante autólogo), implica pérdida de tejido limbar del ojo sano (aproximadamente seis husos horarios), lo que supone riesgo de desarrollar SIL bilateral. Si por el contrario el trasplante es realizado en pacientes con daño bilateral, en los cuales el tejido limbar procede de un donante compatible vivo o cadáver (trasplante alogénico), el mayor problema es el riesgo de rechazo inmune y la vascularización e inflamación que a menudo se producen. Esto desemboca en una medicación continuada del receptor con corticoides e inmunosupresores, con el gasto sanitario y la morbilidad que esto conlleva.

Una forma de minimizar la posible lesión del ojo donante, en el caso de los trasplantes autólogos, y el riesgo de inflamación y rechazo, en el caso de los trasplantes alogénicos, es realizar un trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro*, ya que la cantidad de tejido limbar necesario para realizar la expansión celular es mínima y los cultivos celulares obtenidos a partir de estos tejidos tienen muy pocas células presentadoras de antígenos, lo cual disminuye su inmunogenicidad (revisado por¹²⁴) (Figura 21).

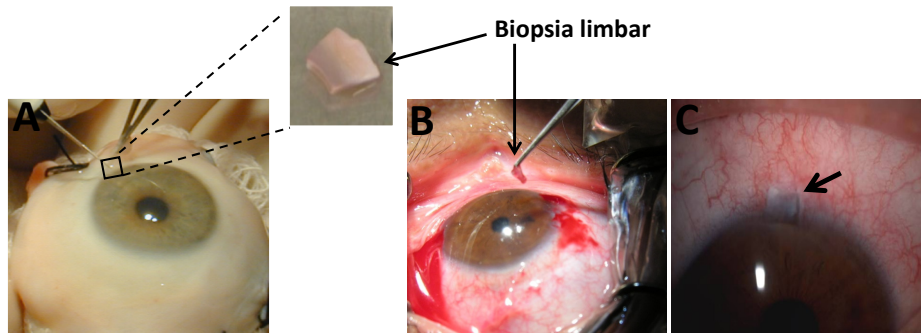


Figura 21. Trasplantes autólogos y alogénicos. (A) Biopsia limbar ($2 \times 1 \text{ mm} = 1-4 \text{ mm}^2$) recogida de un donante cadáver, en esta caso, el trasplante siempre será alogénico. (B) Biopsia limbar ($1-4 \text{ mm}^2$) recogida de un donante vivo, en este caso el trasplante puede ser alogénico (en el que el donante y receptor son diferentes sujetos) o autólogo (en el que el donante y receptor son la misma persona). (C) Herida creada a las 24 horas de haber tomado la biopsia en el nicho limbar del ojo sano.

Además de utilizar células epiteliales limbares, durante los últimos años se ha investigado la posibilidad de utilizar células epiteliales orales cultivadas *in vitro* para el tratamiento del SIL. Para ello, se han realizado diferentes estudios, cuyos primeros resultados fueron esperanzadores, ya que se comprobó que las células epiteliales orales podían ser expandidas en condiciones similares que las células epiteliales limbares, proporcionando así una nueva fuente de células autólogas para el tratamiento de SIL. Sin embargo, se observó que cuando se trasplantaban células epiteliales de mucosa oral aparece más vascularización en la córnea que cuando se ponen injertos de células epiteliales limbares.^{125,126} Por otro lado, se observó que en condiciones similares de cultivo, la función de barrera epitelial de los cultivos primarios de epitelio oral estaba más alterada que la que proporcionaban las células epiteliales limbares. Esto podría afectar en un posterior trasplante, ya que por ejemplo, una menor función barrera hace más probable una infección microbiana.¹²⁷ Además, se ha comprobado que existe un patrón de expresión diferencial de marcadores específicos de epitelio oral y limbar,¹²⁵ presentando el epitelio limbar unas características más idóneas para conseguir cultivos celulares con un elevado número de células madre que permitan la regeneración de la superficie ocular dañada. Estos resultados han favorecido continuar los tratamientos clínicos utilizando el epitelio limbar como fuente de células madre, así como focalizar los estudios de investigación en el trasplante de CMEL.

4. Trasplante de CMEL cultivadas *in vitro* y terapia celular

Esta técnica fue desarrollada por primera vez por Pellegrini *et al* en 1997¹²⁸ y, en términos generales consiste en el aislamiento de células epiteliales limbares (entre las que se encontrarían las CMEL) de un nicho limbar sano, su posterior cultivo *in vitro* sobre un soporte determinado originando un cultivo primario de limbo (CPL) y, finalmente, el trasplante del complejo soporte-células epiteliales limbares a la superficie ocular del receptor (Figura 22). Desde entonces, se han desarrollado diferentes aproximaciones a esta técnica, utilizando diferentes sustratos, diferentes técnicas de aislamiento celular y diferentes condiciones de cultivo.

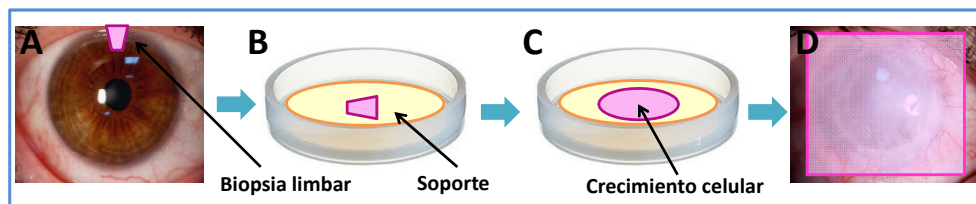


Figura 22. Esquema de la metodología seguida para realizar un trasplante de células epiteliales limbares expandidas *in vitro*. (A) Se extrae del ojo donante una biopsia de unos 1-4 mm². (B) La biopsia (explante) es sembrada sobre el soporte de cultivo. (C) Las células de epitelio limbar crecen a partir del explante hasta alcanzar una superficie de cultivo de 2-3 cm². (D) El complejo soporte-células epiteliales limbares es trasplantado al ojo receptor. Modificado de "Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med 2000; 343:86-93".

El trasplante de células de CMEL cultivadas *in vitro* representa uno de los primeros y más claros éxitos de la medicina regenerativa, concretamente en el campo de las terapias avanzadas, enmarcando los CPLs trasplantados como productos de terapias avanzadas.

Los productos de **terapias avanzadas** son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico, que constituyen nuevas estrategias terapéuticas y cuyo desarrollo contribuye a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces (*European Medicines Agency, EMA*). Concretamente, el trasplante de CMEL *in vitro* se considera un producto de terapia celular, definiendo la **terapia celular** como la utilización en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas como alogénicas, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones de células autólogas *ex vivo*, la utilización de células

alogénicas y xenogénicas asociadas a productos sanitarios, empleados *ex vivo* o *in vivo* (RD 1345/2007, definición de terapia celular).

Actualmente, el trasplante de CMEL cultivadas *in vitro* es el tratamiento de elección para los pacientes diagnosticados de SIL. Sin embargo, la metodología utilizada para ello presenta diferentes limitaciones y está todavía en continua controversia. Hasta el momento, muchos grupos de investigación, incluido el nuestro,¹²⁹ han presentado buenos y esperanzadores resultados clínicos utilizando distintas variaciones en el método de cultivo de las células epiteliales limbares.^{124,128,130-134} Por ello, muchas investigaciones básicas, también incluidas en este caso las realizadas por nuestro grupo de investigación,^{135,136} están centradas en este área, con el propósito de optimizar la expansión *in vitro* de CMEL y de entender mejor los mecanismos celulares que las regulan.

5. Limitaciones y controversias del trasplante de CMEL

5.1. Escasez de donaciones de tejidos limbares

Desafortunadamente, a día de hoy, las donaciones de tejidos oculares tanto para la práctica clínica como para la investigación son muy escasas. Este hecho, junto con la avanzada edad de los donantes, dificultan y ralentizan enormemente los tratamientos clínicos que dependen de la disposición de tejidos donantes, entre los que se encuentran el trasplante de CMEL expandidas *in vitro*, así como todas las investigaciones necesarias, tanto para optimizar los tratamientos ya existentes como para seguir desarrollando nuevas potenciales terapias.

En el caso de los trasplantes de CMEL expandidas *in vitro*, es necesario partir de un tejido limbar donante, que puede ser de tamaño variable dependiendo de si el tejido procede de un donante vivo (trasplante autólogo o alogénico a partir de un familiar) o de un donante cadáver (trasplante alogénico). En el primero de los casos se realiza una biopsia de 1-4 mm² al donante y la limitación del tejido es debida a que la obtención de varias biopsias podría suponer el desarrollo de SIL en el ojo sano del propio paciente, originando un SIL bilateral, o en el ojo sano del donante vivo. Por otro lado, la limitación de tejido en los trasplantes alogénicos de donante cadáver, en los que se puede utilizar desde una pequeña biopsia hasta el anillo limbar completo, es debida al limitado número de donantes propiamente dicho. Pero, en ambos casos, existe una limitación en la obtención de CPLs para ser trasplantados, ya sea por una causa u otra. Directamente, esto implica una disminución en el número de trasplantes que se pueden realizar. Además, si durante las distintas etapas pre- y post-implante hay complicaciones y finalmente el tratamiento fracasa, hay que volver a realizar un

nuevo trasplante, lo que implica un tiempo de espera para el paciente. Por otro lado, en el caso de trasplantes en los que se utilizan tejidos procedentes de donantes vivos, un fracaso del trasplante conlleva la recogida de una nueva biopsia, lo que aumenta de nuevo el riesgo de generar SIL en un ojo sano.

5.2. Utilización de compuestos potencialmente nocivos en el cultivo de CMEL

Las condiciones de cultivo en las que se tienen que mantener las células epiteliales limbares durante su expansión *in vitro* están actualmente en continuo debate. Uno de los factores más importantes que están actualmente en el punto de mira es el medio de cultivo utilizado,¹³⁷⁻¹⁴¹ encontrando en ocasiones suplementos en su composición que pueden comprometer el posterior uso clínico de los cultivos primarios obtenidos.

Durante mucho tiempo, los medios de cultivo utilizados en la expansión *in vitro* de CMEL han estado suplementados con productos de origen animal. En diversos ensayos clínicos de trasplante de células epiteliales limbares expandidas *in vitro* se suplementó el medio de cultivo con suero fetal bovino (FBS),^{128,131,142-144} por sus propiedades proliferativas y no diferenciadoras.¹⁴⁵ Sin embargo, esto implica un alto riesgo de zoonosis por la transmisión de bacterias, virus u otros agentes infecciosos, como por ejemplo los priones, responsables de la transmisión de la encefalopatía espongiforme.¹⁴⁶

Otro de los compuestos problemáticos usados normalmente en la expansión celular *in vivo* de CMEL es la toxina colérica,^{128,131,132,142,144,147,148} endotoxina responsable del cólera, cuyo uso en cultivo *in vitro* está justificado por la capacidad que tiene para inducir la proliferación celular.^{149,149,150} Aunque este compuesto es utilizado en cantidades muy pequeñas y su purificación e inactivación están altamente controladas y reguladas, el riesgo de transmisión de la enfermedad permanece aún presente.¹⁴⁶

El dimetilsulfóxido (DMSO) es otro componente utilizado con frecuencia en el cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares como protector frente a radicales libres.¹⁵¹ Sin embargo, el DMSO puede inducir apoptosis en los cultivos de células epiteliales corneales,¹⁵¹ así como efectos secundarios en los pacientes en los que se utiliza durante el procedimiento de aplicación de diferentes terapias celulares.^{152,153}

En los últimos años, se han desarrollado diferentes medios de cultivo, los cuales han sido testados con la finalidad de mejorar la bioseguridad de los trasplantes de CMEL cultivadas *in vitro*. Varios grupos de investigación han desarrollado composiciones en las que la toxina colérica y el DMOS fueron eliminados, mientras que el FBS era sustituido por suero humano (SH).^{137,140,154-156} Sin embargo, la eliminación de la toxina colérica y el DMSO puede disminuir

la proliferación celular y comprometer el balance del estrés oxidativo celular, respectivamente. Recientemente, Stasi et al. han desarrollado varios medios de cultivo en los cuales el FBS y otros compuestos potencialmente nocivos para el organismo humano han sido reemplazados por componentes bioseguros.¹⁴¹ Estos autores demostraron que estos medios de cultivo permitían cultivar CMELs cuando se utilizaban fibroblastos de origen animal y de origen humano como sustratos.

5.3. Falta de consenso en el método de aislamiento de las CMEL del nicho limbar

A día de hoy, se utilizan principalmente dos métodos para el aislamiento de las CMEL del nicho limbar para establecer un CPL. Uno de los métodos es el aislamiento celular mediante el cultivo de explantes limbares. Este proceso consiste en la obtención de biopsias limbares con un tamaño que varía entre 1 y 6 mm², formadas histológicamente por epitelio y estroma limbar, y su posterior cultivo sobre un soporte (Figuras 21 y 22). En muchas ocasiones, los explantes limbares son tomados de la región superior o inferior del anillo limbar debido a la mayor cantidad de CMEL existentes en estas regiones,^{136,157} aunque esto varía dependiendo de los estudios y la finalidad de los mismos (revisado por¹²⁴).

El otro método de aislamiento de CMEL del nicho limbar más utilizado consiste en la obtención de células epiteliales limbares en suspensión mediante disgregación enzimática tisular. Este proceso se lleva a cabo mediante tratamientos enzimáticos. En general, primero se realiza un tratamiento enzimático que separa las células epiteliales de la membrana basal. La enzima utilizada para este proceso es generalmente la dispasa, que rompe las uniones celulares con la membrana basal pero no entre ellas. Este primer paso va seguido por un segundo tratamiento enzimático, normalmente llevado a cabo por la tripsina, a través del cual se rompen las uniones célula-célula, obteniendo de esta forma una suspensión de células sueltas que posteriormente son sembradas y cultivadas (Figura 23). Estos tratamientos enzimáticos se pueden realizar sobre un explante limbar (generalmente en casos de trasplante autólogo) o en porciones mayores del anillo limbar (en casos de trasplante alogénico) (revisado por^{124,130}).

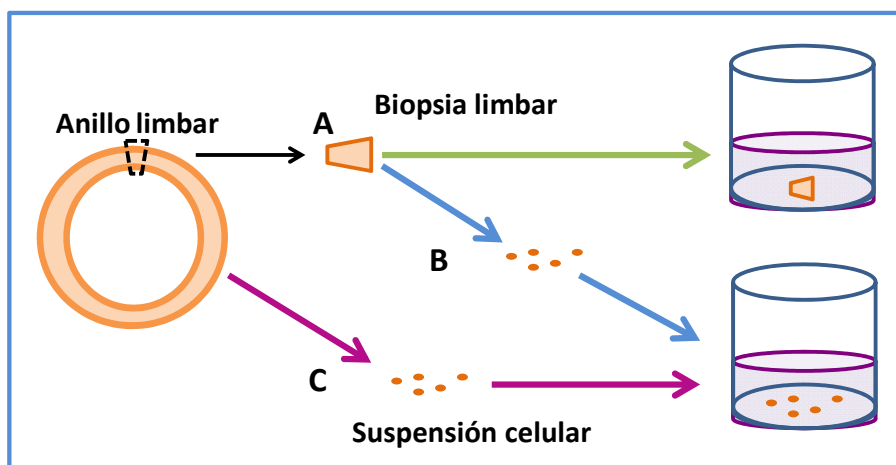


Figura 23. Diferentes técnicas de asilamiento de células epiteliales del nicho limbar. Obtención de cultivos primarios de limbo a partir de (A) explantes limbares (1-6 mm²) o a partir de (B y C) suspensiones celulares obtenidas mediante disgregación enzimática de tejidos limbares.

Cada uno de estos procesos tiene una serie de ventajas e inconvenientes. Una de las ventajas del uso de explantes es su fácil preparación y manipulación. Además, la ausencia de tratamiento enzimático evita posibles daños y/o alteraciones en el epitelio limbar. Lo contrario sucede con el uso de células en suspensión. El procedimiento supone más inversión de tiempo y el uso de enzimas puede alterar levemente el epitelio limbar (revisado por ^{124,130}). Sin embargo, durante el cultivo de los explantes limbares tiene lugar una migración de las células epiteliales hacia el soporte utilizado, lo que puede dificultar la obtención de células madre limbares, ya que éstas se encuentran en la capa más basal del epitelio. Además, existe la posibilidad de contaminación de los cultivos primarios con células no epiteliales. La disgregación enzimática, por el contrario, puede facilitar la obtención de las CMEL de las regiones más profundas y evitar la contaminación de los CPLs con otros tipos celulares.

Ambas técnicas son utilizadas actualmente en la clínica humana (revisado por ¹³⁴) y, aunque hay varios trabajos que han intentado determinar cual de ellas es más eficaz respecto al número de CMEL obtenidas, ninguno ha llegado a establecer diferencias significativas entre ellas.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el SIL afecta a 5-7 millones de personas en todo el mundo. En total, estimamos que afecta al 50-70% de los 10 millones de pacientes que están afectados por enfermedades corneales causantes de ceguera, siendo por tanto el SIL la segunda causa de ceguera en el mundo tras las cataratas.¹⁵⁸

Hasta hace relativamente poco tiempo, el tratamiento quirúrgico que se aplicaba en un paciente afectado por SIL era el mismo que cuando la causa del daño corneal era cualquier otra patología, un trasplante de córnea. Sin embargo, los trasplantes de córnea realizados en este tipo de pacientes están condenados al fracaso, ya que la córnea trasplantada tiene una vida limitada debido a la falta de células madre que lleven a cabo la regeneración de su epitelio. Para suplir esta carencia, actualmente se realizan trasplantes de CMEL cultivadas *in vitro*, que además de aportar una fuente de células madre a la superficie ocular aporta estabilidad a la misma. Sin embargo, este tratamiento no permite la recuperación visual de los pacientes si existe una opacidad corneal profunda, siendo necesaria para ello la realización posterior de un trasplante de córnea. La combinación de ambas terapias, el trasplante de CMEL expandidas *in vitro* seguido de un trasplante de córnea, constituyen en el presente el único tratamiento que permite la mejora, la estabilización y la regeneración parcial de la superficie ocular afectada por SIL. Sin embargo, existen diferentes problemas que dificultan realizar de forma satisfactoria los trasplantes de CMEL expandidas *in vitro*.

Uno de los problemas es el escaso número de tejidos donantes disponibles, lo que tiene como consecuencia directa la limitación del número de cultivos celulares limbares que se pueden obtener y por tanto la cantidad de trasplantes que se pueden realizar. Además, durante las distintas etapas pre- y post-implante pueden surgir diferentes problemas, como por ejemplo que la expansión celular inicial no sea exitosa, que se produzca alguna complicación durante la cirugía, que el injerto una vez trasplantado sea rechazado por el receptor, etc. En todos estos casos se ha de volver a realizar un nuevo trasplante, lo que implica la necesidad de disponer de un nuevo tejido donante. La obtención del mismo se puede llevar a cabo tomando una nueva biopsia de un donante vivo o de un donante cadáver, aumentando el riesgo de generar SIL en un ojo sano y/o de desencadenar una reacción de rechazo inmune en el receptor. En ambos casos, se genera además un periodo de espera entre los diferentes trasplantes, durante el cual los signos clínicos pueden empeorar, y un incremento del ya elevado del coste sanitario, debido a las nuevas expansiones celulares e intervenciones quirúrgicas.

Otro de los problemas que está actualmente presente es la falta de consenso en las técnicas de aislamiento y cultivo celular, lo que, entre otras, tiene como consecuencia el desconocimiento de qué protocolo de cultivo es el más eficaz, y a que los resultados

generados por distintos grupos de investigación clínica y preclínica no se puedan comparar, impidiendo establecer un protocolo eficiente.

Uno de los factores implicados en la expansión de las CMEL que está en continua controversia es el medio de cultivo utilizado, que a menudo conlleva el uso de suplementos de origen animal que pueden causar zoonosis y el uso de compuestos potencialmente nocivos para el organismo humano que pueden generar diferentes efectos secundarios. Otro factor respecto al que existe una importante falta de consenso es el método de aislamiento de las CMEL del nicho limbar, lo cual implica que en ocasiones los cultivos primarios obtenidos no sean de buena calidad, conteniendo, por ejemplo, una cantidad excesivamente pequeña de CMEL.

En este contexto, esta tesis doctoral pretende optimizar la utilización de los tejidos donantes existentes permitiendo obtener varios cultivos primarios a partir de una única biopsia limbar y/o crear un reservorio de cultivos primarios para cada paciente trasplantado, de tal forma que los potenciales problemas que surjan durante el trasplante puedan ser fácilmente solventados, reduciendo la posibilidad de generar SIL en ojos sanos y los posibles rechazos inmunes, así como el tiempo de espera entre trasplantes y los costes sanitario. A día de hoy, existen dos trabajos en los que se haya descrito el subcultivo consecutivo de una misma biopsia limbar,^{159,160} aunque en ambos casos la finalidad última de esta expansión era diferente a la aquí propuesta, por lo que los experimentos realizados y los resultados obtenidos en dichos estudios no pueden esclarecer la posibilidad de usar para trasplante los cultivos primario obtenidos de la expansión consecutiva del mismo explante limbar.

Por otro lado, este trabajo pretende optimizar las técnicas de cultivo *in vitro* de CMEL, evitando el uso de componentes de origen animal y/o potencialmente nocivos para el organismo humano, mejorando así la bioseguridad de los cultivos trasplantados, y estableciendo qué protocolo de aislamiento celular permite obtener CPLs con mayor cantidad de células indiferenciadas, mejorando de esta forma la calidad de los cultivos obtenidos. Aunque numerosos grupos de investigación han realizado estudios basados en estos objetivos,^{137,140,155,161-163} hasta hace tres meses no existía todavía un medio de cultivo para la expansión de CMEL *in vitro* en cuya composición los compuestos de origen animal y los componentes potencialmente nocivos hubiesen sido reemplazados simultáneamente por componentes bioseguros.¹⁴¹ Estos autores demostraron que un medio de cultivo con dichas características permitía cultivar CMELs cuando se utilizaban fibroblastos como sustratos. Sin embargo, no demostraron su efectividad sin el uso de este soporte de naturaleza celular. Además, hasta el momento no se ha demostrado que un medio de cultivo con estas características permita el cultivo consecutivo una misma biopsia limbar. Por otro lado, en ningún trabajo previo se han realizado estudios en los comparen diferentes técnicas de

aislamiento de las CMEL del nicho limbar analizando la expresión de diferentes marcadores celulares a la vez que se analizaba la funcionalidad de las células epiteliales en los CPLs obtenidos.

La finalidad última de este trabajo es la transferencia a la práctica clínica habitual de los nuevos protocolos optimizados para el cultivo *in vitro* de CMEL, mejorando así la calidad de los trasplantes realizados, para reconstruir de forma más eficaz la superficie ocular afectada por SIL y disminuir los posibles efectos secundarios, así como el gasto sanitario generado. Además, el conocimiento generado en esta tesis doctoral podría ser transferido a diferentes grupos que aplican esta terapia, con la posibilidad de establecer protocolos estandarizados que permitirían comparar los distintos resultados obtenidos por cada uno de ellos, permitiendo de esta forma futuras mejoras en el diagnóstico y tratamiento de pacientes afectados con SIL.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Es posible optimizar los procedimientos utilizados actualmente para el cultivo *in vitro* de CMEL aumentando el número de CPLs disponibles, mejorando la bioseguridad de los mismos e incrementando la cantidad de CMEL presentes en los los trasplantes al ser humano de epitelio limbar cultivado.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1. Aumentar el número de CPLs disponibles mediante el desarrollo de un protocolo que permita establecer CPLs consecutivos, con un elevado porcentaje de CMEL, partir de una única biopsia limbar.
2. Obtener CPLs bioseguros con una población rica en CMELs utilizando un medio de cultivo carente de componentes de origen animal y de compuestos potencialmente nocivos.
 - 2.1. Determinar la composición de un medio de cultivo carente de componentes de origen animal y de compuestos potencialmente nocivos que permita obtener CPLs con un elevado porcentaje de CMELs.
 - 2.2. Establecer CPLs a partir de pases consecutivos de una única biopsia limbar utilizando la composición del medio de cultivo diseñado.
3. Determinar qué método de aislamiento de células epiteliales del nicho limbar, de los utilizados actualmente, permite generar cultivos primarios con mayor cantidad de CMEL.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de líneas celulares inmortalizadas

Todos los procedimientos explicados en este apartado fueron realizados en el laboratorio de cultivos celulares del IOBA bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (BH-EN 2004, FASTER) irradiada con luz ultravioleta y limpiando las superficies de la misma con una solución de etanol al 70% (v/v) en agua.

1.1. Línea celular de epitelio corneal humano (*Human Corneal Epithelium*, HCE)

La línea celular fue cedida por el Dr. Arto Urti (Universidad de Helsinki, Finlandia) y fue mantenida siguiendo sus recomendaciones. La línea celular HCE fue generada a través de la transfección de células epiteliales corneales humanas, procedentes de cultivo primario, mediante el adenovirus SV40.¹⁶⁴

Las células fueron sembradas en frascos específicamente tratados para cultivo celular a una concentración aproximada de 10.000 células/cm² e incubadas con medio de cultivo DMEM/F12-GlutaMAXTM (*Dulbecco's modified Eagle médium/Ham's F12 solution*) (1:1) suplementado con 62,5 U/ml de penicilina, 62,5 µg/ml de estreptomina, 0,5% de DMSO, 0,1 µg/ml de toxina colérica, 0,01 µg/ml de EGF (*Epithelial Growth Factor*, factor de crecimiento epitelial), 5 µg/ml de insulina y 15% de FBS. El medio de cultivo se cambió cada dos 2 o 3 días. El cultivo se mantuvo hasta que las células alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia, momento en el que fueron lavadas con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) 1X e incubadas con tripsina 0,25%-1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) durante 5 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Seguidamente, la acción de la tripsina-EDTA fue neutralizada con medio de cultivo suplementado con FBS. La suspensión celular fue centrifugada durante 5 min a 123 g (X-22 R, Allegra), desechando el sobrenadante y volviendo a resuspender las células en una cantidad de medio de cultivo conocida. Seguidamente, se contó el número de células vivas obtenidas siguiendo el método azul tripán-cámara de Neubauer (Marienfeld). Para ello, se realizó una dilución 1/5 de la suspensión celular con azul tripán, colorante que no penetra en las células con una membrana plasmática bien estructurada, pero que sí puede entrar en las células que están muertas o en proceso de apoptosis, ya que su membrana celular está desestructurada. La suspensión celular teñida con este compuesto se colocó en una cámara de Neubauer (Marienfeld), en la que se contó el número de células vivas (no teñidas) y el número de células muertas (teñidas). Conociendo el número de células vivas que había en la suspensión, se realizó una siembra celular en las mismas condiciones. De esta forma, la línea celular se mantuvo de forma continuada.

1.2. Línea celular de carcinoma de colon humano (HT29-MTX)

Esta línea celular fue cedida por el Dr. Thècla Lesuffleur (INSERM U843, Paris, Francia) y fue cultivada siguiendo sus recomendaciones.¹⁶⁵ La línea celular HT29 propiamente dicha fue establecida en 1964 por J Fogh (base de datos ATCC) a partir de células humanas de carcinoma de colon. En 1990, Lesuffleur *et al.* separaron dos subpoblaciones diferentes dentro de la línea celular HT29, la HT29-MTX y la HT29-FU, que se diferencian entre ellas por la morfología celular y el tipo de mucinas que secretan.¹⁶⁶

Las células fueron sembradas en frascos de cultivo específicamente tratados e incubadas con medio de cultivo DMEM (25mM glucosa) suplementado con 100U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina y 10% de FBS. El medio de cultivo se cambió cada dos o tres días. El cultivo celular se mantuvo hasta que las células alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia, momento en el que fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con tripsina 0,25 %-1 mM EDTA-4Na durante 5 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Seguidamente, la acción de la tripsina-EDTA fue detenida con medio de cultivo suplementado con FBS. La suspensión celular fue centrifugada 5 min a 123 g (X-22, Allegra™), desechando el sobrenadante y volviendo a resuspender las células en una cantidad de medio de cultivo conocida. Las células fueron cultivadas de nuevo siguiendo el protocolo explicado anteriormente, así las células fueron mantenidas de forma continuada.

1.3. Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón albino (3T3/J2)

Esta línea celular fue adquirida en la casa comercial ATCC (CCL-92) y se cultivó siguiendo las recomendaciones de la Dra. Julie T Daniels.¹⁶⁷ La línea celular fue establecida en 1962 por Todaro G. y Green H, a partir de disgregados celulares de embriones de ratón albino.¹⁶⁸

Las células fueron sembradas en frascos de cultivo específicamente tratados a una densidad celular de 3000-5000 células/cm² e incubadas con medio de cultivo específico para fibroblastos, compuesto por DMEM-GlutaMAX™ (4,5 g/l glucosa y sin piruvato) suplementado con una solución de antibiótico-antifúngico 1X y 10% de FBS. El medio de cultivo se cambió cada 2 o 3 días. Las células fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. El cultivo se mantuvo hasta que las células alcanzaron el aproximadamente el 80% de confluencia, momento en el que fueron levantadas, incubándolas durante 2 min a 37°C con una solución tripsina-EDTA 1X. Posteriormente, la acción de la enzima fue detenida con medio de cultivo específico de fibroblastos y la suspensión celular fue centrifugada durante 5 min a 123 g (X-22, Allegra™). Después de desechar el sobrenadante, las células vivas fueron contadas con el método azul tripán-

cámara Neubauer (Marienfeld) y sembradas en las mismas condiciones explicadas anteriormente. De esta forma, la línea celular fue mantenida de manera continuada.

2. Procesado y fijado de tejidos humanos

Todos los procedimientos realizados con muestras de origen humano fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA y el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Además, todos los experimentos se desarrollaron de acuerdo a las directrices de la Declaración de Helsinki y siguiendo la normativa del RD1716/2011 en el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y tratamiento de las muestras biológicas de origen humano.

Las muestras de tejido corneoescleral (limbo) humano fueron obtenidas del Banco de Ojos Barraquer (Barcelona, España) de donantes cadáver cuyos tejidos oculares no pudieron ser utilizados para trasplante. Los tejidos fueron conservados desde la enucleación hasta su uso en el laboratorio en medio de cultivo a 4°C.

Todo el procesado fue realizado bajo condiciones de esterilidad utilizando una (BH-EN 2004, FASTER) de flujo laminar irradiada con luz ultravioleta y limpiando las superficie de la misma con una solución de etanol al 70% (v/v) en agua. El material quirúrgico utilizado fue esterilizado en autoclave (STATIM S000S, Scican).

Durante el procesado, todas las muestras fueron lavadas con solución de Hanks (*Hanks Balanced Salt Solution*, HBSS) suplementado con 50 µg/ml de gentamicina y 2,5 µg/ml de anfotericina B. Parte de estas muestras fueron posteriormente fijadas directamente con formaldehído al 4%, embebidas en el compuesto Tissue-Tek-OCT® y conservadas a -80°C hasta su uso.

Las muestras humanas de tejidos de piel y de amígdala fueron obtenidas del Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco (León, España). Estas muestras fueron fijadas directamente con formaldehído al 4%, posteriormente embebidas en el compuesto Tissue-Tek-OCT® y guardadas a -80°C.

3. Preparación de cultivos primarios

Al igual que el cultivo de las diferentes líneas celulares, los procedimientos detallados en este apartado fueron realizados bajo condiciones de esterilidad utilizando una (BH-EN 2004, FASTER) de flujo laminar irradiada con luz ultravioleta y limpiando las superficie de la misma con una solución de etanol al 70% (v/v) en agua. El material quirúrgico utilizado fue esterilizado en autoclave (STATIM S000S, Scican).

3.1. Cultivos primarios de epitelio limbar

Los tejidos corneoesclerales que no fueron fijados directamente se utilizaron para establecer cultivos primarios de epitelio limbar. Después de un lavado con tampón salino HBSS suplementado con 50 µg/ml de gentamicina y 2,5 µg/ml de anfotericina-B, el exceso de conjuntiva, esclera, iris y endotelio fue retirado utilizando tijeras, pinzas y escarificador. Por otro lado, el botón corneal fue separado con ayuda de un trépano de 7,5 mm de diámetro, obteniendo de esta forma el anillo limbo-escleral (Figura 24). Las células epiteliales limbares fueron aisladas del tejido mediante dos técnicas diferentes y fueron incubadas con diferentes medios de cultivo:

3.1.1. Métodos de aislamiento de células epiteliales limbares

3.1.1.1. Preparación de explantes limbares

El anillo limbar fue troceado en su totalidad con ayuda de un bisturí en porciones de 1-4 mm² (explantes limbares). De cada anillo limbar se obtuvieron aproximadamente 24 explantes limbares y cada uno de ellos fue colocado con el epitelio hacia arriba en el centro de un pocillo de poliestireno con una superficie de cultivo de 3,8 cm². Los explantes permanecieron durante 30 min bajo el flujo laminar de una campana (BH-EN 2004, FASTER) y posteriormente fueron incubados con 50 µl de FBS o SH (dependiendo del medio de cultivo con el que los tejidos fueran a ser incubados) durante toda la noche a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa para facilitar la adhesión del tejido a la superficie de cultivo. Finalmente, se añadieron 500 µl de medio de cultivo por pocillo hasta que las células comenzaron a migrar desde el tejido hacia el soporte de cultivo, momento en el que se empezó a añadir 1 ml de medio de cultivo por pocillo. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa y el medio de cultivo fue cambiado cada dos o tres días (Figura 25). Cuando las células rodearon por completo el explante limbar, éste fue retirado para que toda la superficie del pocillo pudiera ser cubierta por células. Se consideró que los cultivos estaban en estado de confluencia cuando ocuparon aproximadamente el 90% de la superficie del pocillo.

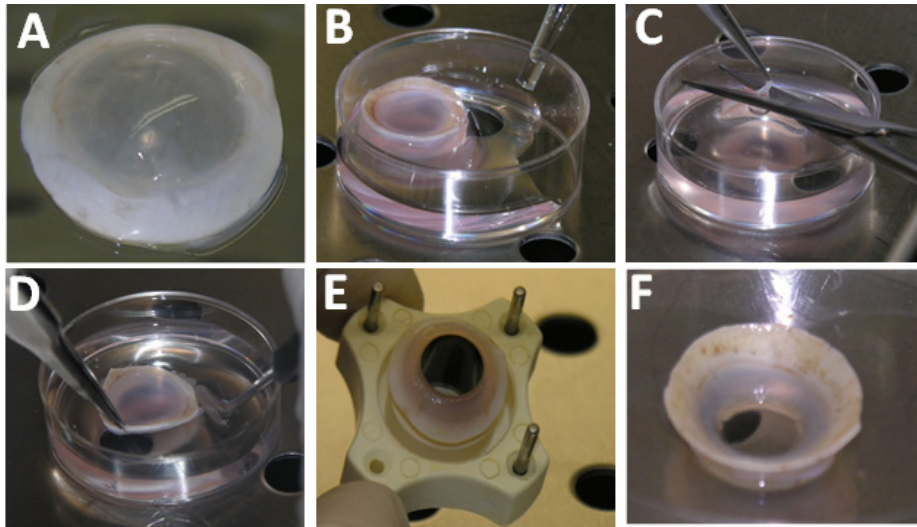


Figura 24. Procesamiento de muestras humanas corneoesclerales. (A) Botón corneo-limbo-escleral enviado desde el Banco de Ojos. En la imagen se puede diferenciar la córnea (parte central traslúcida), la esclera (zona blanca opaca) y la conjuntiva (“membrana” de color amarillento que está encima de la esclera). (B) Los tejidos fueron lavados con tampón salino, antibióticos y antifúngicos. (C) Posteriormente, se retiró la conjuntiva utilizando tijeras, el iris (región coloreada que se encuentra al dar la vuelta a la muestra) y (D) el endotelio corneal rascando con un escarificador. (E) Finalmente, se extrajo el botón corneal con ayuda de un trépano. (F) De esta forma, se obtuvo el anillo limbar.

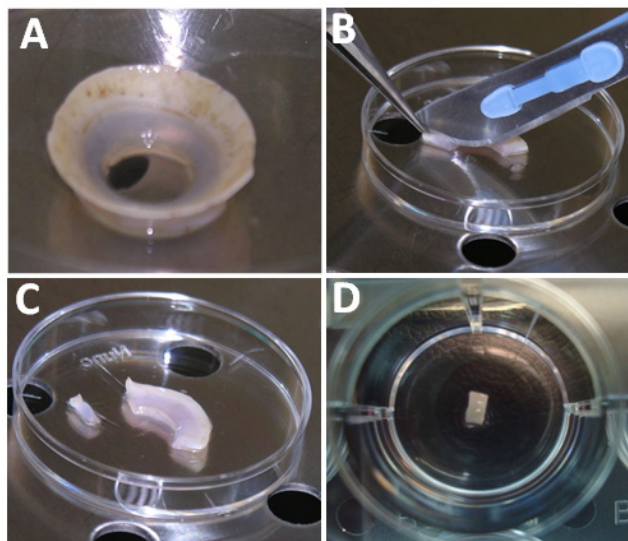


Figura 25. Aislamiento de células epiteliales limbares a partir de explantes limbares. (A) El anillo limbar fue troceado en (B) porciones de 1-4 mm² con ayuda de un bisturí, (C) generando los denominados explantes limbares. (D) Cada explante limbar fue colocado en el centro de un pocillo de cultivo con el epitelio hacia arriba.

Parte de los explantes limbares obtenidos fueron cultivados de forma consecutiva. En este caso, los explantes fueron mantenidos en cultivo hasta que las células epiteliales lo rodearon por completo. En este momento, el explante era levantado, mientras que el CPL ya iniciado se dejaba crecer hasta alcanzar confluencia, obteniendo de esta forma el primer CPL (CPL0). Por otro lado, el mismo explante era sembrado de nuevo en otra placa de cultivo en las mismas condiciones explicadas anteriormente. Este protocolo fue repetido varias veces para obtener los CPL1, CPL2, etc.

3.1.1.2. Preparación de suspensiones celulares

Para realizar esta técnica, el anillo limbar era seccionado a la mitad con un bisturí. Cada una de las mitades era incubada en una placa Petri de 35 mm con el epitelio orientado hacia abajo en dispasa II (1,2 U/ml) durante 2 h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, con la finalidad de separar enzimáticamente el epitelio limbar de la lámina basal. Posteriormente, se realizó un raspado mecánico del epitelio con un escarificador y la capa celular obtenida se incubó con tripsina 0,25%-1 mM EDTA-4Na durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Este paso se realizó para obtener una suspensión celular en la que las células estuviesen disgregadas entre ellas, ya que la dispasa II no realiza esta función. La acción de la tripsina 0,25 %-1 mM EDTA-4Na fue detenida al añadir medio de cultivo suplementado con suero, bien FBS o SH, dependiendo del medio de cultivo que fuera a ser utilizado para el desarrollo final del cultivo. La suspensión celular obtenida se centrifugó durante 5 min a 156 g y se resuspendió con el mismo medio de cultivo en el que posteriormente se cultivarían (Figura 26). Finalmente, se contó el número de células vivas obtenidas con el método azul tripán - cámara Neubauer (Marienfeld) y se sembraron 15.000 c/cm² en un volumen final de 300 µl de medio. Las células permanecieron en estas condiciones durante 2 h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa para favorecer la adhesión celular al sustrato. Seguidamente, se añadieron 200 µl más de medio de cultivo, manteniendo estas condiciones hasta que las células ocuparon, aproximadamente, la mitad de la superficie de cultivo, momento en el que se añadió 1 ml total de medio de cultivo por pocillo. El medio de cultivo fue cambiado cada dos o tres días hasta que las células ocuparon aproximadamente el 90% de la superficie de cultivo, lo que se consideró como un cultivo confluyente.

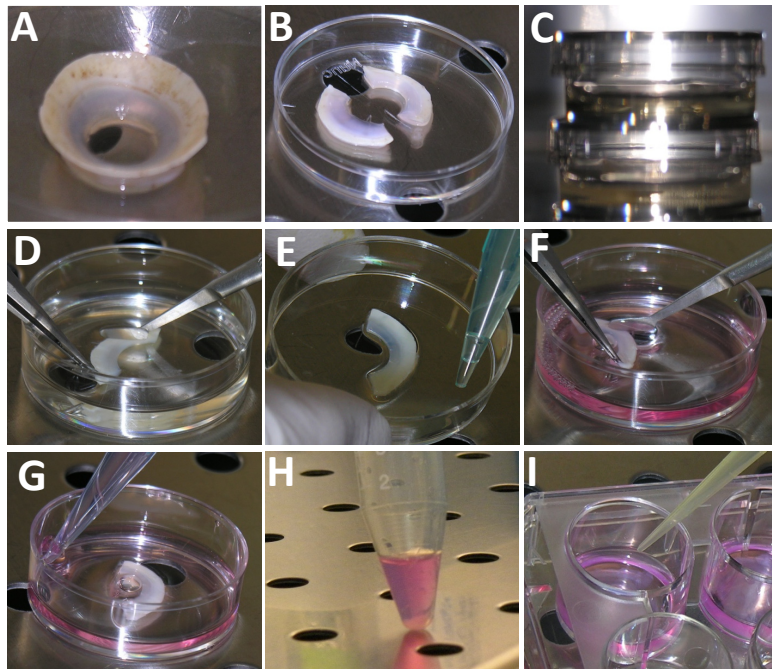


Figura 26. Aislamiento de células epiteliales limbares a partir de suspensiones celulares. (A) El anillo limbar era (B) dividido a la mitad. (C) Cada una de las mitades era incubada con dispa II. (D) Seguidamente, el epitelio limbar era raspado mecánicamente con ayuda de un escarificador y (E) las células obtenidas eran recogidas. (F y G) Estos dos últimos pasos eran repetidos una vez más. (H) Posteriormente, la suspensión celular era incubada con tripsina-EDTA. (I) Finalmente, las células en suspensión eran sembradas sobre poliestireno para su cultivo.

3.1.2. Medios de cultivo utilizados

3.1.2.1. Medio de cultivo CnT20

El medio de cultivo comercial CnT20 está diseñado específicamente para el cultivo de células epiteliales corneales progenitoras. Su composición exacta es desconocida, pero se sabe que no está suplementado con ningún tipo de suero. Posee una baja concentración de calcio (0,07 mM) y está suplementado con aminoácidos, minerales, vitaminas y compuestos orgánicos, pero no con proteínas (<http://www.cellIntec.com/products/corneal/culture-media/cnt-20>).

3.1.2.1. Medios de cultivos diseñados para el desarrollo de los objetivos propuestos

Se diseñaron diferentes medios de cultivo que fueron utilizados para el cultivo de células de epitelio limbar en el desarrollo de los distintos objetivos (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados para el cultivo de células epiteliales limbares. En todos los casos el medio base utilizado fue DMEM/F12 (1:1). En los medios de cultivo IOBA-toxina colérica, IOBA-FBS e IOBA-SH la insulina, la transferrina y el selenio fueron añadidos al medio de cultivo utilizando la solución comercial ITS (Insulina-Transferrina-Selenio).

Compuesto	IOBA-toxina colérica	IOBA-FBS	IOBA-SH	IOBA-SH bioseguro
Gentamicina	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Anfotericina-B	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml
Insulina	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
Transferrina	5,5 µg/ml	5,5 µg/ml	5,5 µg/ml	-
Sodio-Selenio	5 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml	-
Hidrocortisona	0,01 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,4 µg/ml
EGF	2,5 ng/ml	2,5 ng/ml	2,5 ng/ml	5 ng/ml
Toxina colérica	132,5 ng/ml	-	-	-
Isoproterenol	-	1 µM	1 µM	1 µM
Adenina	-	0,18 mM	0,18 mM	0,18 mM
Triiodotironina	-	2 nM	2 nM	2 nM
DMSO	0,5%	-	-	-
FBS	5%	10%	-	-
SH	-	-	10%	10%

3.2. Cultivos primarios de fibroblastos limbares

Los pasos seguidos hasta obtener el anillo limbar y separar el epitelio del estroma limbar (dispara II) fueron los mismos que los descritos anteriormente. Posteriormente, el estroma fue troceado con ayuda de un bisturí y tratado con colagenasa tipo I (2 mg/ml) durante toda la noche a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Este tratamiento enzimático se utilizó para romper las fibras de colágeno presentes en el estroma limbar y liberar así los fibroblastos embebidos en las mismas. Posteriormente, la acción de la colagenasa I fue detenida con medio de cultivo específico para fibroblastos limbares (detallado a continuación) y la suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 277 g. El sobrenadante fue desechado y las células obtenidas fueron sembradas a una concentración entre 3.000 y 5.000 células/cm² en frasco de cultivo e incubadas con medio de cultivo específico para este tipo celular. El medio base utilizado fue DMEM + GlutaMAX™ 1X (1 g/L glucosa y piruvato)

suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, MEM NEAA (*Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids*, aminoácidos no esenciales) 100X (1:100) y 10% de FBS. El medio de cultivo se cambió cada dos o tres días. Las células se dejaron crecer hasta que alcanzaron el 80-90% de confluencia. En ese momento las células fueron levantadas del sustrato utilizando tripsina-EDTA 0,05% durante 5 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Seguidamente, la acción de la tripsina-EDTA fue detenida con medio de cultivo y los fibroblastos fueron sembrados de nuevo en las mismas condiciones explicadas anteriormente (Figura 27). Este protocolo fue repetido hasta tener las células en un pase 3, momento en el que el cultivo primario de fibroblastos limbares quedaba listo para su uso.

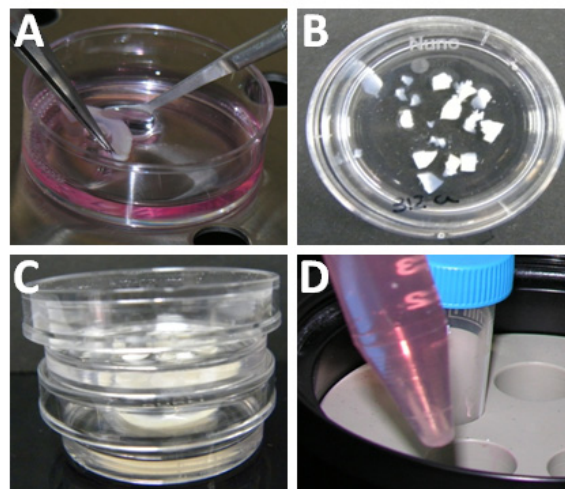


Figura 27. Metodología utilizada para establecer cultivos primarios de fibroblastos del estroma limbar humano. (A) Las células del epitelio limbar eran retiradas. (B) Posteriormente el estroma limbar era troceado con un bisturí e (C) incubado con colagenasa I. (D) La suspensión celular obtenida era centrifugada y finalmente sembrada.

4. Análisis del rendimiento de los cultivos primarios de epitelio limbar

Para realizar estos experimentos definimos como rendimiento de los CPLs al número de cultivos que alcanzan el estado de confluencia, el tiempo necesario para que alcancen dicho estado, el número de células presentes en cada cultivo confluyente y la viabilidad de las mismas.

Para ello, se realizó un seguimiento de los cultivos con un microscopio óptico invertido de contraste de fases (Eclipse TS100, Nikon). El número de CPLs iniciados, bien a partir de explantes limbares o a partir de suspensiones celulares fue anotado, así como el número de cultivos que llegaron al estado de confluencia. Se calculó el porcentaje de cultivos confluentes, considerando el 100% el número de CPLs iniciados. Por otro lado, se calculó el tiempo necesario para alcanzar dicho estado. En el caso de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes, se calculó también el tiempo transcurrido desde la siembra del explante hasta que las células que migraron desde el tejido hacia el soporte rodearon por completo al explante. Este último dato es un dato bastante subjetivo, ya que en ocasiones el explante puede estar más rodeado de células por una región que por otra, por lo que este dato debe ser tratado con precaución teniendo en cuenta esta limitación.

Para calcular el número de células presentes en cada CPL confluyente se levantaron las células incubándolas con tripsina 0,25%-1 mM EDTA-4Na durante 5 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Posteriormente, la acción de la tripsina fue detenida con medio de cultivo suplementado con suero y esta suspensión celular fue centrifugada 5 min a 123 g (X-22, Allegra™). El sobrenadante fue desechado, mientras que el precipitado celular fue resuspendido en 500 µl de medio de cultivo. El número total de células vivas y de células muertas fue calculado siguiendo el método azul tripán-cámara de Neubauer (Marienfeld), explicado anteriormente. Además, se calculó la viabilidad celular (porcentaje de células vivas) siguiendo la fórmula expuesta a continuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

5. Análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica de contraste de fases

La morfología celular se analizó mediante la observación y toma de fotografías de diferentes campos ópticos en un microscopio óptico invertido de contraste de fases (Eclipse TS100, Nikon). Para calcular el tamaño celular, se tomaron fotografías de los CPLs a 20X aumentos con el microscopio invertido de contraste de fases y se midió el diámetro mayor y menor de, al menos, tres células seleccionadas al azar de una misma imagen. Las imágenes analizadas procedían de, al menos, tres donantes distintos (se tomó una imagen por donante) en cada condición analizada.

6. Análisis de la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica de transmisión

La ultraestructura celular se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, los cultivos primarios fueron establecidos sobre cubres de Thermanox[®]. Cuando los cultivos se realizaron a partir explantes, se utilizaron cubres con una superficie de cultivo de 3,8 cm² dentro de placas de cultivo de 6 pocillos (9,6 cm²). Sin embargo, cuando los CPLs fueron establecidos a partir de suspensiones celulares, se utilizaron cubres con una superficie de cultivo de 1,8 cm² dentro de placas de cultivo de 24 pocillos (1,8 cm²), en los que se sembraron 15.000 células/cm². Los CPLs se llevaron a cabo de la misma forma que cuando se realizaron directamente sobre el poliestireno. Cuando los cultivos cubrieron el 90% de la superficie del cubre, éstos fueron lavados y levantados de los pocillos con ayuda de unas pinzas y las células fueron fijadas sobre ellos con solución de Karnovsky (1,25% de glutaraldehído y 1% de paraformaldehído disueltos en tampón cacodilato 0,2 M) a 4°C. Las muestras permanecieron en estas condiciones hasta que fueron utilizadas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X en agitación y se realizó el tratamiento de la muestra con tetraóxido de osmio 1% (v/v) en agua destilada a temperatura ambiente durante 2 h en agitación. Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas, realizando tres incubaciones de 5 min en cada una de las disoluciones de etanol de gradación creciente: 50%, 60%, 90% y 100%. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con óxido de propileno, realizando tres incubaciones de 10 min. Después se trataron con óxido de propileno-resina y finalmente las muestras fueron incluidas en resina. Cuando la resina solidificó, se realizó el tallado de las muestras y cortes semifinos, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina para visualizar a microscopio óptico (Eclipse TS100, Nikon) la región de la muestra en la que se estaban realizando los cortes. Posteriormente, en las zonas de interés de las muestras se realizaron cortes ultrafinos de aproximadamente de 50 nm de espesor. Se prepararon muestras de dos tipos, unas en las que los cortes se realizaron paralelos al cubre y otras en las que los cortes

fueron perpendiculares. Los cortes se colocaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y/o citrato de plomo, que tiñen los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. Posteriormente, se realizó un lavado de las muestras con agua destilada y se dejaron secar. Parte de las muestras fueron preparadas por la unidad de microscopía electrónica del “*Institute of Ophthalmology, University College of London*”, mientras que la otra parte fueron preparadas entre el IOBA y la unidad de microscopía electrónica de la Universidad de Valladolid. Finalmente, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010, 80 Kv, cámara SC1000 Orius CCD Gatan (University College of London) o JEOL JEM-1011 HR, 60-100 Kv, cámara ES1000W CCD, Gatan (Universidad de Valladolid).

7. Tinción de ácido periódico de Schiff (*periodic acid-Schiff, PAS*)-hematoxilina

Tres explantes limbares procedentes de tres donantes diferentes fueron analizados histológicamente mediante la técnica PAS-hematoxilina antes y después de ser cultivados seis veces consecutivas. Las muestras fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con formaldehído al 4% durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar el fijador y se realizaron dos incubaciones de 10 min a temperatura ambiente con sacarosa al 5%. Posteriormente, los tejidos fueron incubados toda la noche con sacarosa al 30% a 4°C. Finalmente se realizó una incubación de 30 min en sacarosa al 30% a Tª ambiente y se incluyeron en compuesto Tissue-Tek-OCT®. Una vez realizada la inclusión, se realizaron cortes de 5 µm de espesor utilizando un criostato (CM19000, Leica), que fueron colocados sobre portas de vidrio tratados con poli-L-lisina y guardados a -80°C hasta su uso.

Para realizar la tinción PAS-hematoxilina, las muestras fueron lavadas con agua destilada dos veces e incubadas con ácido periódico 0,5 % durante 5 min y seguidamente se incubaron con reactivo de Schiff durante 12 min. Ambos pasos se realizaron a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se tiñeron con Hematoxilina Gill II 0,05%. Seguidamente, se realizaron varios lavados: primero un lavado con agua corriente, seguido de un lavado con alcohol clorhídrico durante 2 min y finalmente otro lavado con agua. , se realizó una deshidratación de la muestra con alcoholes al 80%, 96% y 100%. Para poder visualizar las muestras al microscopio óptico de campo claro, (Eclipse TS100, Nikon) las muestras fueron montadas con solución de Entellan.

8. Análisis de expresión proteica por inmunofluorescencia

8.1. Preparación de muestras procedentes de tejidos humanos

Las muestras de tejido humano (corneosclerales, de piel y de amígdala) anteriormente fijadas e incluidas en Tissue-Tek-OCT[®] fueron cortadas en un criostato (CM19000, Leica), obteniendo secciones de aproximadamente 5 µm. Estas muestras fueron posteriormente descongeladas y fijadas en metanol frío durante 10 min a -20°C.

8.2. Preparación de muestras procedentes de cultivos celulares

Las muestras celulares procedentes del cultivo de las líneas celulares HCE y HT29-MXT y de los cultivos primarios de epitelio y fibroblastos limbares fueron preparadas cuando dichos cultivos alcanzaron el estado de confluencia. En ese momento, las células fueron levantadas incubándolas con tripsina 0,25%-1 mM EDTA-4Na durante 5 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Seguidamente, la acción de la tripsina-EDTA fue inactivada con medio de cultivo. La suspensión celular fue centrifugada durante 5 min a 123 g (X-22, Allegra™), desechando el sobrenadante y volviendo a resuspender las células en una cantidad de medio de cultivo conocida. Seguidamente, se contó el número de células vivas obtenidas con el método azul tripán - cámara Neubauer (Marienfeld). Las muestras para inmunofluorescencia fueron preparadas de dos formas diferentes:

8.2.1. Preparación de muestras en placas de Permanox[®] multipocillos

Las células obtenidas se sembraron en placas de Permanox[®] de 8 pocillos (1,8 cm²/pocillo). La densidad celular de siembra fue diferente para los distintos tipos celulares: 12.500 células/cm² en el caso de células HCE y de células procedentes de CPLs, 150.000 células/cm² cuando se trataba de células HT29-MXT y 5.000 células/cm² cuando se sembraron fibroblastos humanos limbares procedentes de cultivos primarios. Todos los tipos celulares fueron incubados durante toda la noche a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa con el medio de cultivo correspondiente. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado, se realizaron dos lavados con PBS y las células se fijaron con metanol frío durante 10 min a -20° C. Finalmente, se dejó evaporar el metanol a temperatura ambiente y las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

8.2.2. Preparación de muestras mediante centrifugado celular

Esta metodología sólo fue realizada con parte de los cultivos primarios de epitelio limbar. Con las células obtenidas, se preparó una suspensión celular en la que las células estaban a una concentración de 40.000-50.000 células/250 µl de DMEM/F12 (1:1) sin suplementar. Posteriormente, las células en suspensión fueron colocadas en unos soportes de plástico (*Shandon EZ-double cytofunnels*) específicos para realizar la técnica de centrifugado celular, en los que va incluido un porta de vidrio tratado con poli-L-lisina.¹³⁶ El soporte con la suspensión celular fue centrifugado en una centrífuga específica para estos soportes a 123 g (*cytospin 4, Thermo Scientific-Shandon*) y aceleración baja durante 10 min. Después de la centrifugación, las células quedaron adheridas al porta, cubriendo un área de 28 mm² por cada 250 µl de solución celular preparada, encontrándose en cada porta dos de estas áreas. Seguidamente, las muestras fueron fijadas con metanol frío durante 10 min a -20° C. Finalmente, el metanol se dejó evaporar a temperatura ambiente y las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

8.3. Técnica de inmunofluorescencia

Las diferentes muestras fueron descongeladas y colocadas en una cámara húmeda, donde se realizó todo el proceso. Las muestras fueron lavadas con PBS 1X dos veces durante 5 min. A continuación, las muestras fueron permeabilizadas con Tritón al 0.3 % en PBS 1X durante 10 min, lavadas tres veces durante 5 min con PBS 1X e incubadas 1 h con solución de bloqueo (suero de burro al 5% en PBS 1X). Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizado este paso, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse 1:200 o Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit 1:200 o 1:300) durante 1 h y lavadas tres veces con PBS 1X durante 5 min. (Figura 28). Seguidamente, los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (1:12000) durante 10 min. Finalmente, las muestras fueron lavadas dos veces con PSS 1X y montadas con medio de montaje Vector®. Todos los procesos fueron realizados a temperatura ambiente excepto la incubación con los anticuerpos primarios. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio óptico invertido de fluorescencia (DM4000B, Leica). Las imágenes fueron tomadas con los objetivos de 20X y 40X aumentos. Se calculó el porcentaje de células que expresaban cada uno de los marcadores analizados. Para ello, se contaron las células positivas y las células totales de cinco campos (20X aumentos) del microscopio elegidos al azar. En todos los experimentos, se incluyeron controles negativos omitiendo los anticuerpos primarios.

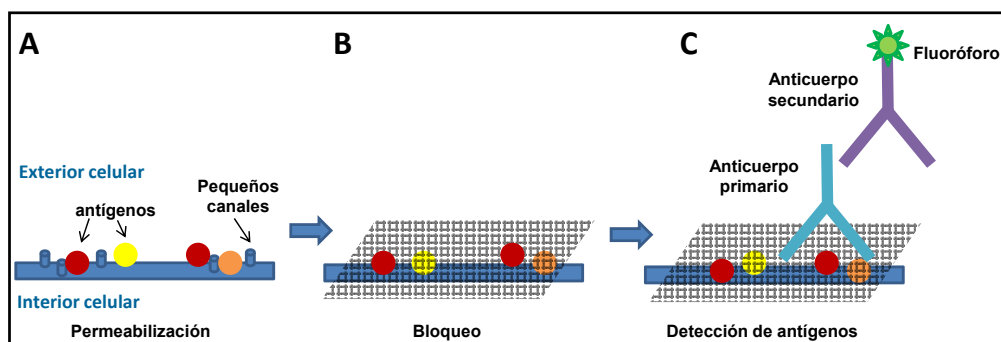


Figura 28. Técnica de inmunofluorescencia indirecta. (A) En primer lugar se realiza la permeabilización de la muestra, generando pequeños poros en las membranas celulares que permiten la entrada de los anticuerpos. La permeabilización solo es necesaria si los antígenos que se quieren detectar están localizados en el interior celular. (B) Después se realiza un bloqueo, que impide que los anticuerpos reaccionen con regiones no específicas. (C) Finalmente, se hace la incubación con anticuerpos primarios frente al antígeno que se quiere detectar y con el anticuerpo secundario que reconoce al primario y que lleva un fluoróforo que emite fluorescencia a una longitud de onda determinada.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de antígenos mediante inmunofluorescencia.

Anticuerpos	Clon	Dilución	Especificidad de interés
Citoqueratina 3 (K13)	AE5	1:50	Células epiteliales corneales
Citoqueratina 12 (K12)	H-60	1:50	Células epiteliales corneales
Citoqueratina 14 (K14)	RCK107	1:50	Células madre epiteliales limbares
Citoqueratina 15 (K15)	LHK15	1:50	Células madre epiteliales limbares
Proteína transportadora ABCG2	BXP-21	1:20	Células indiferenciadas
Factor de transcripción nuclear p63 (objetivos 1 y 2)	4A4	1:50	Células indiferenciadas
Factor de transcripción nuclear p63 isoforma α (objetivo 3)	-	1:50	Células madre epiteliales limbares
Molécula de adhesión endotelial PECAM	Ab-1	1:20	Células endoteliales
Antígeno asociado a melanoma MART1	A103	1:50	Melanocitos
Proteína transmembrana S100A4	1B10	1:50	Fibroblastos
Integrina alfaX	b-ly6	1:100	Células dendríticas
Marcador de proliferación Ki67	MIB-1	1:50	Células en proliferación

9. Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa, (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

9.1. Lisado celular de muestras procedentes tejido

Seis córneas y seis anillos limbares, que habían sido previamente congelados (por separado), se descongelaron a temperatura ambiente y, posteriormente, el epitelio de ambas regiones fue raspado con ayuda de un escarificador. La fracción epitelial obtenida fue depositada en tampón de lisis de ARNm, compuesto por β -mercaptoetanol y tampón "RLT RNeasy® Mini Kit" (1:100), obteniendo dos muestras, una de epitelio corneal y la otra de epitelio limbar, ambas formadas por la mezcla de epitelios procedentes de seis donantes. Por otro lado, el epitelio de tres anillos limbares más fue raspado con el objetivo de separar el epitelio y el estroma de estas muestras. El epitelio fue desechado y el tejido estromal fue incubado con tampón de lisis (utilizando 20 μ l de tampón por cada mg de tejido en la incubación), cortado mecánicamente con un bisturí y homogeneizado en un mortero de cristal. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 15.000 g durante 3 min (Microfuge® 18, Beckman Coulter™) y el sobrenadante fue congelado a -80°C hasta su posterior uso.

9.2. Lisado celular de muestras procedentes de cultivos primarios

Cuando los cultivos primarios de epitelio limbar alcanzaron el estado de confluencia se procedió a la extracción del ARNm celular. Para ello, se realizaron dos lavados con PBS 1X de los cultivos y seguidamente se añadió tampón de lisis de ARNm. A continuación se raspó la superficie sobre la que estaban creciendo las células y se recogieron todos los restos celulares producidos. Posteriormente, los lisados fueron congelados a -80°C hasta su uso.

9.3. Extracción, homogeneización y purificación del ARNm

Para llevar a cabo la homogeneización y purificación del ARN total de las muestras se utilizó el kit de extracción comercial RNeasy® Mini Kit.

Para ello, se colocaron las muestras en columnas Qiashredder, las cuales contienen un polímero sintético de fibras cortantes con efecto triturador introducido en un tubo colector de 2 ml, y se centrifugaron durante 2 min a 15.000 g (Microcentrifuge 8, Beckman Coulter). Una vez homogeneizadas las muestras, se añadieron 700 μ l de etanol 70% al eluido. De esta mezcla, se dispusieron 700 μ l en la columna RNAeasy-mini. Seguidamente se realizó una centrifugación a 9.000 g durante 30 s y se desechó el eluido, consiguiendo que el ARN quedase adherido a la columna de cromatografía. Posteriormente, se procedió a lavar la columna tres veces. Primero se añadieron 700 μ l de tampón RW1 y se centrifugó a 9.000 g

durante 30 s; por último, se añadieron otros 500 µl de tampón RPE y se centrifugó a 15.000 durante 30 s. Seguidamente, con el fin de secar las membranas de las columnas cromatográficas, las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 1 min. Para eluir el ARN enlazado en dicha membrana, se añadieron 100 µl de agua libre de RNAsas, se realizó una incubación de 10 min y se centrifugó a 9.000 g durante 1 min. El ARN purificado fue conservado a -80°C hasta su uso (Figura 29). Para eliminar posibles contaminaciones de las muestras con ADN genómico, el ARN se trató con una ADNasa (*RNAase-Free DNase Set*) previo a la disolución del ARN en agua, mediante la incubación de las muestras con la ADNasa durante 15 min a temperatura ambiente

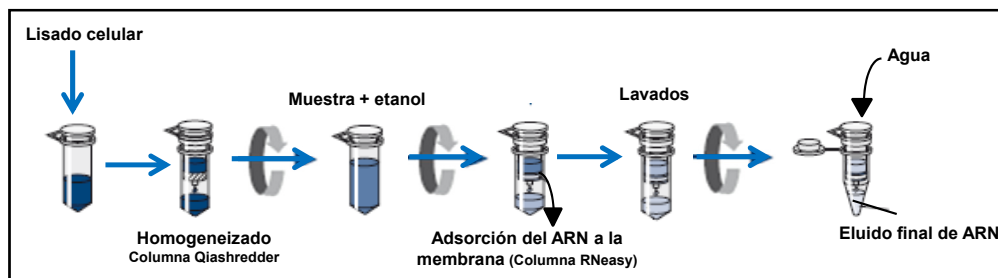


Figura 29. Procedimiento para la extracción, homogeneización y purificación del ARNm procedente de diferentes muestras. El lisado celular se introduce en una columna Qiashtredder, donde el ARNm es homogeneizado. Posteriormente, el ARNm se pasa por una columna RNeasy en la cual se queda adherido y es sometido a varios lavados. Finalmente, el ARNm es eluido con agua, obteniendo una muestra pura y homogénea de ARNm.

9.4. Cuantificación del ARN

Una vez purificado el ARN, se realizó la cuantificación del mismo. Para ello, se utilizó el kit comercial *Quant-iT RNA Assay*. Este kit consta de un reactivo (*Quant-iT RNA reagent*) que se une al ARN emitiendo una cantidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de ARN y un tampón de dilución (*Quant-iT RNA buffer*), que en una dilución 1:200 constituye la solución de trabajo. Además, incluye dos soluciones estándar (*Quant-iT Standard 1 y 2*) de concentración conocida para calibrar el lector. Se preparó un tubo con 190 µl de solución de trabajo y 10 µl de *Quant-iT Standard 1*. Del mismo modo, se preparó otro tubo con el *Quant-iT Standard 2*. Por otro lado, se preparó un tubo para cada muestra con 199 µl de solución de trabajo y 1 µl de muestra. Se incubaron durante 10 min y se midió la fluorescencia en el Qubit-fluorómetro (Invitrogen). En primer lugar, se midió la cantidad de ARN en las muestras estándares para calibrar el aparato, seguido de las muestras problema a cuantificar.

9.5. Síntesis del ADN complementario (ADNc): retrotranscripción

Durante esta etapa, el ARN de la muestra se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit de síntesis *SuperScript® Vilo™* (Invitrogen). Mediante este kit, se genera una hebra de ADNc gracias a la acción de la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* a alta temperatura. El ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN. Para llevar a cabo esta reacción se preparó una disolución con el y los reactivos del Kit en una proporción 7 (ARNm disuelto en agua):1 (*5X Vilo Reaction Mix*) 2: (10X *SuperScript Enzyme Mix*). Dicha disolución fue sometida a un ciclo de temperaturas: 10 min a 25°C, 120 min a 42°C y, finalmente, 5 min a 85°C en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El ADNc fue conservado a -20°C hasta su uso (Figura 30).

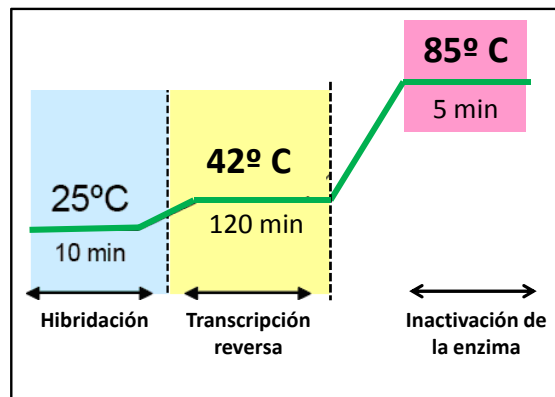


Figura 30. Ciclos de temperatura para la transcripción inversa del ARN a ADN complementario utilizando el kit de síntesis *SuperScript® Vilo™*.

9.6. Amplificación y cuantificación génica relativa mediante PCR a tiempo real

La expresión génica se detectó mediante la utilización de sondas TaqMan®. Estas sondas están formadas por una combinación de nucleótidos que se unen de forma específica, debido a su complementariedad, a una secuencia diana que se encuentra entre los cebadores que permiten la amplificación de nuestro gen de interés. De esta forma, las amplificaciones inespecíficas no son detectadas. Las sondas TaqMan® llevan acoplado un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* (amortiguador) en el extremo 3'. Un fluoróforo es una molécula que pasa a un estado excitado al absorber energía y, posteriormente, la emite en forma de fluorescencia al volver a su estado inicial. Los *quenchers* son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan, principalmente, en forma de calor.

En este caso, se utilizó un fluoróforo tipo FAM, que se excita a 492 nm y emite a 515 nm, y un *quencher* tipo MGB (*minor groove binder*). Este *quencher* disipa la energía por un mecanismo denominado *Quenching* colisional, es decir, cuando el fluoróforo está en contacto o muy próximo al *quencher* se produce la transferencia de energía a éste, el cual la disipa en forma de calor. De esta manera, cuando la ADN polimerasa empieza a amplificar a partir del cebador unido al ADN, desplaza el extremo 5' de la sonda, el cual es degradado por la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia (Figura 31). Para llevar a cabo la amplificación de las muestras, se utilizó el tampón de reacción TaqMan Universal PCR Master Mix.¹³⁶ Este preparado comercial contiene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, que es una ADN polimerasa termoestable. Esta enzima tiene actividad 5'→3' exonucleasa, pero ha perdido la actividad 3'→5' exonucleasa. Además, contiene dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato) con dUTPs (2'-desoxiuridina-5'-triosfato), y AmpErase UNG (enzima que se añade al tampón de reacción para degradar productos generados por amplificaciones anteriores y evitar así falsos positivos).

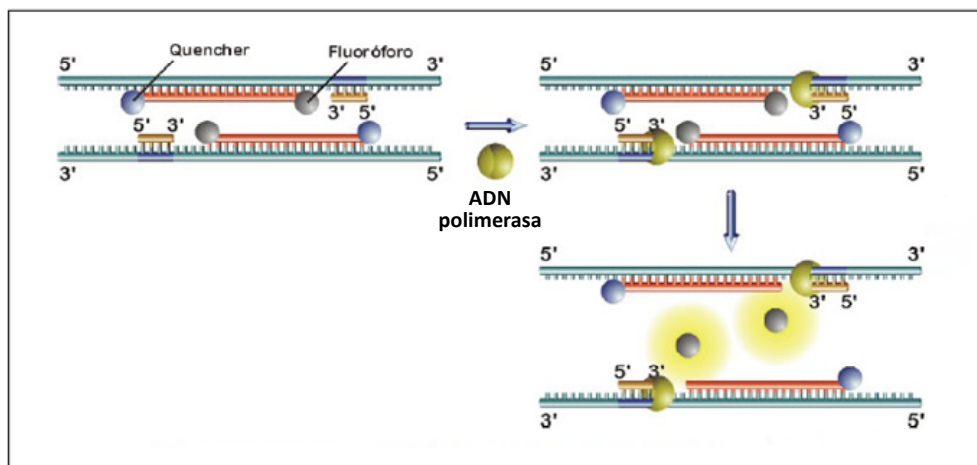


Figura 31. Estructura y mecanismo de acción de las sondas TaqMan®. Las sondas TaqMan® están formadas por una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de un gen específico. Estas sondas llevan acoplado un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* (amortiguador) en el extremo 3'. En primer lugar, las sondas se unen a la región específica del ADNc, para la cual son complementarias, situada entre los cebadores que permiten la amplificación del gen de interés. Posteriormente, la ADN polimerasa comienza a amplificar el ADNc a partir del extremo 3' de los cebadores, mientras desplaza el extremo 5' de la sonda, el cual es degradado por su actividad exonucleasa 5' →3'. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia. Imagen tomada de [www.cultek.com](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/PCR/AplicacionesPCRAmplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf) (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/PCR/AplicacionesPCRAmplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf>).

Se utilizó una placa de 96 pocillos y se colocaron en cada pocillo 18 µl de la solución preparada a partir de: H₂O libre de nucleasas, 20X *Target Primers-Probe* (Tabla 4) y 2X *Taqman Universal PCR Master Mix* en una proporción 7:1:10, respectivamente. Posteriormente, se añadieron en cada pocillo 2 µl de ADNc de cada una de las muestras y se analizaron por duplicado. Las placas fueron incubadas en el termociclador *PCR 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystem) y sometidas a diferentes ciclos de temperaturas (Figura 32).

Tabla 4. Sondas Taqman® y cebadores utilizados para detectar la presencia de los genes de interés mediante RT-PCR a tiempo real (*Applied Biosystems*).

Nombre del gen	Símbolo	Nº identificación	Especificidad de interés
Citoqueratina 3	<i>KRT3</i>	Hs00365080_m1	Células epiteliales corneales
Citoqueratina 12	<i>KRT12</i>	Hs00165015_m1	Células epiteliales corneales
Citoqueratina 14	<i>KRT14</i>	Hs 00559328_m1	CMEL
Citoqueratina 15	<i>KRT15</i>	Hs00267035_m1	CMEL
Proteína transportadora ABCG2	<i>ABCG2</i>	Hs00184979_m1	Células indiferenciadas
Factor de transcripción nuclear p63α	<i>TP63</i>	Hs00978338_m1	Células indiferenciadas
Proteína transmembrana S100A4	<i>S100A4</i>	Hs 00243201_m1	Fibroblastos
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	4352934E	Todos los tipos celulares

CMEL, células madre epiteliales limbares.

Los niveles de expresión del gen *GAPDH* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) fueron utilizados como control endógeno de cada reacción y se utilizaron dos pocillos como controles negativos, en los que se colocaron todos los componentes a excepción de la muestra de ADNc.

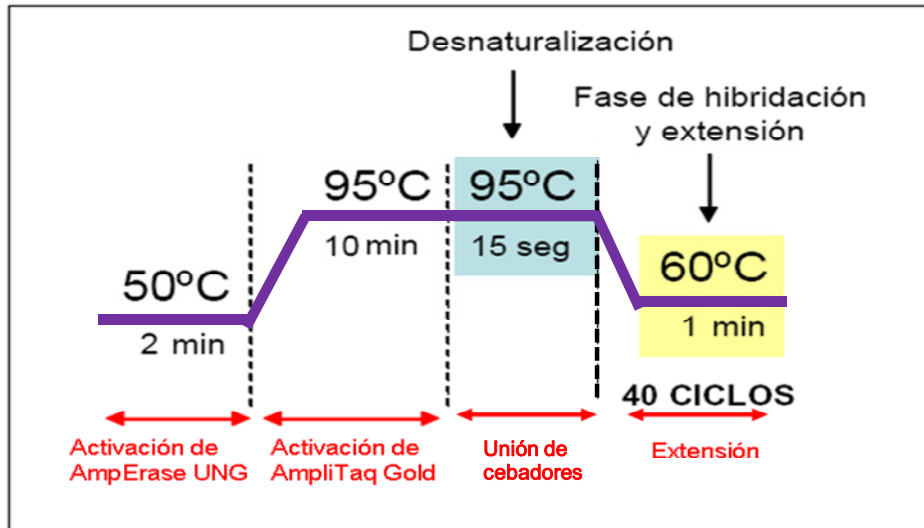


Figura 32. Ciclos de temperatura para la amplificación de ADN complementario mediante PCR a tiempo real.

El análisis de los resultados se realizó siguiendo el método comparativo de ciclos umbrales (Método comparativo Ct, del inglés *cycle threshold*), entendiéndose por Ct el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativa con respecto a la señal base que, además, es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de ADNc. El método comparativo Ct calcula la cantidad de expresión de los genes relativa a un calibrador y la normaliza con un valor endógeno, utilizando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia}$

Y el $\Delta\Delta Ct$ se calcula mediante: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$

Para realizar estos cálculos, una vez finalizada la reacción de PCR, fue necesario establecer el umbral de detección Ct dentro de la fase exponencial de todas las curvas de amplificación. Posteriormente, se analizaron los resultados utilizando la expresión de GAPDH como gen de referencia (control endógeno) y tomando diferentes calibradores dependiendo del tipo de análisis realizado (descrito en la sección de resultados).

10. Ensayos de clonogenicidad celular

10.1. Análisis del número de unidades formadoras de colonias

10.1.1. Siembra de fibroblastos 3T3/J2

Los fibroblastos 3T3/J2 fueron cultivados en frascos de cultivo hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente del 80%. En este momento, la proliferación celular fue detenida incubando las células con 10 µg/ml de mitomicina C a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa durante 2 h. A continuación, los fibroblastos 3T3/J2 fueron lavados dos veces con PBS 1X, levantados de la superficie de cultivo y contados en suspensión. Los fibroblastos se sembraron en placas de Petri de 100 mm de diámetro tratadas para cultivo a una concentración celular de $2,7 \times 10^4$ células/cm². Las células se mantuvieron en el incubador (Galaxy R, RS Biotech) con medio de cultivo específico para esta línea celular durante al menos 5 h para que se adhirieran por completo al sustrato. Posteriormente, los fibroblastos fueron utilizados para el co-cultivo con células epiteliales limbares. Los 3T3/J2 que tenían inhibida la proliferación nunca se dejaron en cultivo más de dos días antes de ser utilizados en los co-cultivos (Figura 35).

10.1.2. Co-cultivo de células epiteliales limbares con fibroblastos 3T3/J2

Se utilizaron células epiteliales limbares procedentes de cultivos primarios. Cuando dichas células alcanzaron el estado de confluencia, se levantaron del sustrato de cultivo y se contaron en suspensión. Posteriormente, las células fueron sembradas en placas de Petri de 100 mm de diámetro sobre los 3T3/J2 preparados como se he explicado en el apartado anterior. Las células epiteliales limbares se sembraron a una concentración de 20 células/cm² y se mantuvieron en cultivo durante 10-11 días, con el medio de cultivo que aparece detallado en la tabla 5.¹⁶⁷ EL medio de cultivo fue cambiado cada dos o tres días (Figura 35).

10.1.3. Fijación de las colonias y recuento de las colonias obtenidas

Durante el tiempo de co-cultivo de las células epiteliales limbares y los fibroblastos 3T3/J2, comenzaron a crecer colonias de células epiteliales. Cada una de estas colonias es considerada como un clon, ya que están formadas por un conjunto de células que provienen todas ellas de una única célula inicial y que, por tanto, son iguales genéticamente entre sí. Las condiciones de co-cultivo celular se mantuvieron durante 10-11 días, momento en el que las placas fueron lavadas con PBS 1X, fijadas con paraformaldehído 2% (15 min a temperatura ambiente) y lavadas de nuevo con PBS 1X. Posteriormente, las colonias fueron teñidas con rodamina 2% durante 3 min a temperatura ambiente y finalmente fueron lavadas bajo el grifo con agua corriente hasta que el exceso de colorante fue eliminado (Figura 35).

Se dejaron secar las placas y se contó el número de colonias obtenidas en cada placa para calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC):

$$\text{UFC} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias obtenidas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células sembradas}} \times 100$$

Tabla 5. Medio de cultivo utilizado para los ensayos de clonogenicidad celular. Se utilizó el medio base DMEM/F12 + DMEM GlutaMAX™ 4,5 g/l glucosa y sin piruvato (1:3) suplementado con los siguientes compuestos:

Compuestos	Concentración
Solución antibiótico-antifúngico 100X	1X
Insulina	5 µg/ml
Transferrina	5 µg/ml
Hidrocortisona	0,4 µg/ml
EGF (se añade justo antes de usar el medio)	10 ng/ml
Toxina colérica	8,5 ng/ml
Bicarbonato sódico	0,075%
Adenina	0,18 mM
Triiodotironina	2 nM
FBS	10%

10.2. Determinación de los tipos de colonias formadas: holoclones, meroclones y paraclones

Además de analizar el número de colonias que se forman a partir de un número concreto de células sembradas (análisis de UFC), Barrandon y Green determinaron que las colonias (clones) formadas pueden ser de varios tipos: holoclones (colonias celulares que proceden de células progenitoras), meroclones (colonias celulares que proceden de células parcialmente diferenciadas) y paraclones (colonias que proceden de células diferenciadas).⁸⁷ De esta forma, siguiendo la metodología establecida por estos autores, se puede determinar la presencia de CMEL funcionales en los cultivos primarios de epitelio limbar (Figura 33).

Para realizar estos ensayos se realizaron co-cultivos de fibroblastos 3T3/J2 y células epiteliales limbares como se ha descrito en los apartados anteriores (9.1.1. y 9.1.2.). En este

tipo de ensayos, los co-cultivos se mantuvieron entre 8 y 9 días, momento en el que las colonias tenían un diámetro de, aproximadamente, 700-900 μm . En este momento, 10 colonias elegidas al azar con ayuda de un microscopio óptico invertido de contraste de fases (Eclipse TS100, Nikon) fueron levantadas de forma individual. Para ello, se realizaron varios pasos. En primer lugar, se levantaron los 3T3/J2 del co-cultivo, para lo cual éste se lavó con PBS 1X una vez y se incubó con una solución de tripsina-EDTA 1X durante 2 min a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Seguidamente, se retiró la tripsina-EDTA de la placa con la suspensión celular obtenida y se realizaron dos lavados con PBS 1X. Mediante este procedimiento los 3T3/J2 fueron levantados de las placas de cultivo, mientras que las colonias de células epiteliales permanecieron en la placa con su morfología inicial. Rápidamente, se colocó un cilindro de vidrio de 5 mm de diámetro encima de cada una de las colonias seleccionadas, de tal forma que la colonia quedase en el centro del cilindro. Posteriormente, se añadió dentro de cada cilindro 150 μl de solución tripsina-EDTA 10X y se dejó actuar durante 5 min a temperatura ambiente. Después de esta incubación se pipeteó la solución tripsina-EDTA 10X+células epiteliales limbares dentro de cada cilindro, recogiendo de esta forma todas las células que formaban cada una de las colonias. Finalmente, las células procedentes de cada colonia fueron depositadas en tubos colectores que contenían cada uno de ellos 10 ml de medio de cultivo específico para los ensayos de clonogenicidad (Tabla 5). Seguidamente, las células en suspensión de cada uno de los tubos colectores fueron sembradas en una placa Petri de 100 mm de diámetro en la que previamente se habían sembrado 3T3J siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.1.1. Las células sembradas se mantuvieron en estas condiciones a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa durante 13 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días (Figura 33).

A los 13 días, las colonias fueron fijadas y teñidas siguiendo el protocolo explicado anteriormente en el apartado 7.1.3. Finalmente, en cada placa se contó el número de colonias terminales y no terminales. Las colonias terminales se caracterizan por presentar una morfología no circular con un tamaño menor de 5 mm² y con bordes irregulares. Las células de este tipo de colonias son en su mayoría grandes y alargadas. Por el contrario, las colonias no terminales presentan forma circular, con bordes regulares y un tamaño que oscila entre 10 y 30 mm². Las células que forman la colonia son pequeñas y alargadas (Tabla 6 y Figura 34)⁸⁷. Dependiendo del número de colonias terminales y no terminales presentes en cada placa, se determinó si las colonias que fueron seleccionadas levantadas al azar eran holoclones, meroclones o paraclones (Tabla 7 y Figura 35).⁸⁷ De esta forma, se pudo determinar la presencia de CMEL funcionales en los cultivos primarios confluentes.

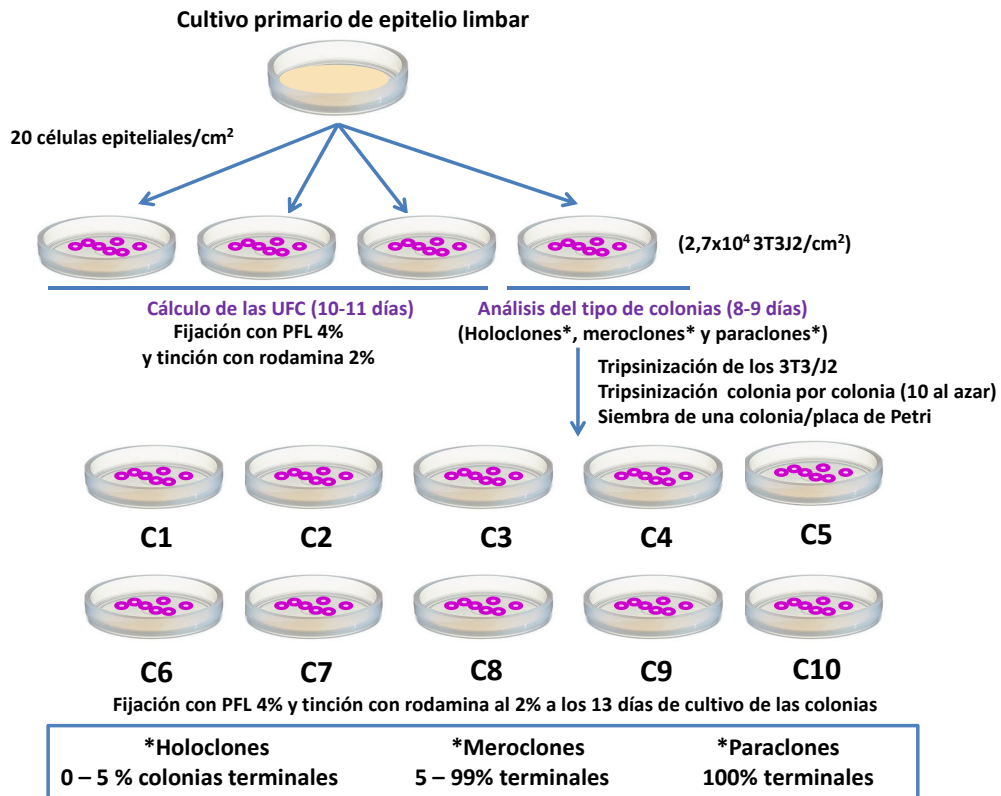


Figura 33. Esquema de la metodología seguida para realizar los ensayos de clonogenicidad. Los ensayos de clonogenicidad se realizaron a partir de un cultivo primario de limbo confluyente. Las células fueron levantadas y sembradas sobre 3T3/J2, cuya proliferación había sido inhibida, a una densidad celular de 20 células/cm². Cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Las células fueron cultivadas en estas condiciones durante 10–11 días y, posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído (PLF) y teñidas con rodamina. Finalmente se calculó el número de colonias obtenidas/número de células sembradasx100. Determinación de los tipos de colonias formadas. Las células fueron cultivadas en estas condiciones entre 8 y 9 días. Posteriormente, se seleccionaron y levantaron 10 colonias al azar. Todas las células procedentes de una misma colonia fueron posteriormente sembradas sobre 3T3/J2 inactivados y se cultivaron en estas condiciones durante 13 días. Finalmente, se contó el número de colonias terminales y no terminales que estaban presentes en cada placa, para determinar si las colonias que fueron seleccionadas y levantadas eran holoclones, meroclones o paraclones.

Tabla 6. Características de las colonias terminales y no terminales.

Características	Terminales	No terminales
Morfología de los bordes	Irregular	Regular
Forma	No circular	Circular
Tamaño	Menos de 5 mm ² (menos de 1260 μm de Ø)	10-30 mm ² (1780-3000 μm de Ø)
Células	Grandes y/o alargadas	Pequeñas y poligonales

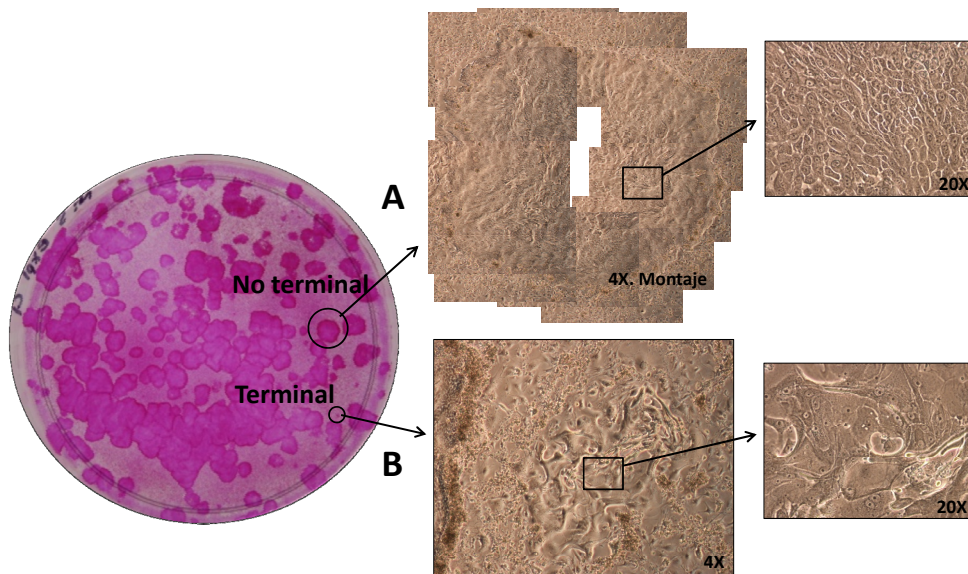


Figura 34. Colonias terminales y no terminales. (A) Morfología macroscópica de las colonias no terminales y (B) terminales fijadas y teñidas con rodamina B. (A) Las colonias no terminales presentan una morfología circular con bordes regulares y tienen un tamaño relativamente grande, (B) mientras que las colonias terminales no son circulares, tienen bordes irregulares y son más pequeñas que las no terminales. Morfología microscópica de ambos tipos de colonias. (A) Las colonias no terminales se caracterizan por tener células pequeñas con morfología poligonal. (B) Por el contrario, las colonias terminales están compuestas por células más grandes y alargadas. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de contraste de fases a 4X y 20X aumentos.

Tabla 7. Tipos de colonias. Características de las colonias tipo holoclon, meroclon y paraclon.

	Holoclon	Meroclon	Paraclon
Morfología de la colonia	Grande Borde regular	Borde con zonas regulares y zonas irregulares	Pequeña Borde totalmente irregular
Morfología de las células de la colonia	Poligonal, típica de células epiteliales	Mezcla de células poligonales y alargadas	Alargada
Porcentaje de colonias terminales formadas en subcultivo	0 – 5%	5 – 99%	100%
Origen	Células progenitoras indiferenciadas	Células amplificadas transitorias	Células diferenciadas

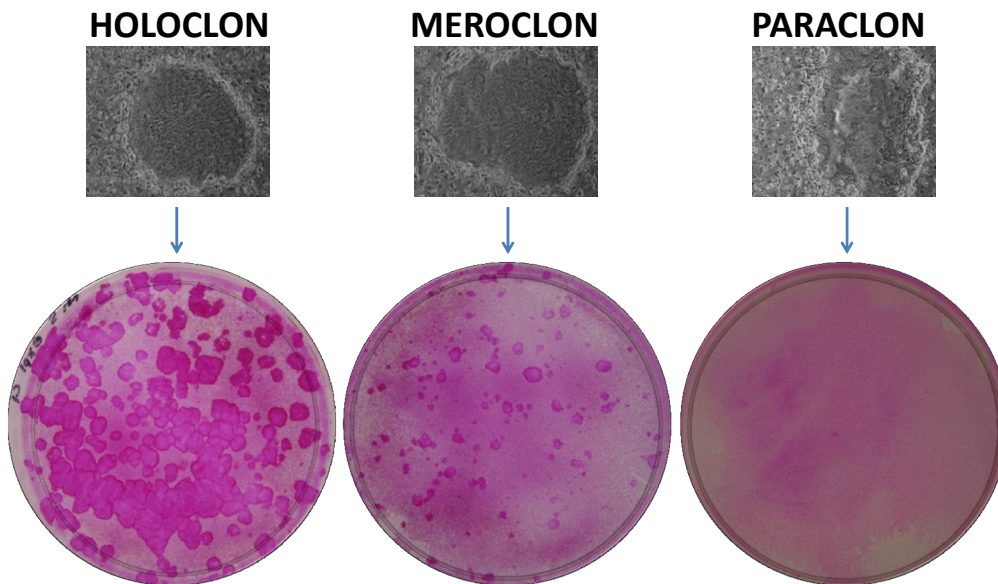


Figura 35. Tipos de colonias que se pueden originar a partir de células epiteliales limbares. Holoclones, meroclones y paraclones. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de contraste de fases a 4X (panel superior) e imágenes representativas de colonias fijadas y teñidas con rodamina B (panel inferior).

11. Análisis estadístico

Todos los valores que aparecen en este trabajo están representados como la media de los experimentos realizados \pm el error estándar de la media (SEM). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Toda la estadística se analizó con el programa estadístico SPSS (SPSS 18.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU), y se contó con la asesoría de la Unidad de Estadística del IOBA (Dra. Itziar Fernández Martínez y Lda. María Eugenia Mateo).

Las diferencias entre distintas condiciones fueron determinadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor, excepto cuando se analizaron los resultados de inmunofluorescencia en el objetivo 1, que se utilizó una ANOVA de 2 factores. En ambos casos, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas (test de Levene) para determinar qué test estadístico aplicar. Se utilizó el test de Games-Howell o el test de Tukey cuando las varianzas fueron diferentes (test de Levene $p < 0,05$) u homogéneas (test de Levene $p > 0,05$), respectivamente.

Por otro lado, las diferencias entre dos condiciones fueron calculadas aplicando el test de t-Student de muestras independientes cuando pudo asumirse homogeneidad de varianzas o el test de Welch cuando no se pudo asumir esta condición.

Todos los datos de RT-PCR a tiempo real fueron normalizados antes de ser analizados. El valor obtenido en cada grupo experimental se evaluó en términos de expresión relativa respecto al grupo calibrador seleccionado en cada caso. Para contrastar si dicha expresión relativa era significativa se utilizó el t-Student para una muestra, contrastando la hipótesis de que dicha expresión es igual a 1. Posteriormente, todos los grupos de datos, excepto el grupo seleccionado como calibrador fueron comparados entre sí utilizando un test de t-Student para muestras independientes o el test de Welch si no era posible asumir homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS

Validación de los diferentes marcadores utilizados

Antes de realizar la caracterización celular de los cultivos primarios se realizó la validación de todos los marcadores que se querían utilizar. Por un lado, se analizó la especificidad de los anticuerpos utilizados en controles positivos y negativos. Los cultivos de células HCE se utilizaron como controles positivos para los anticuerpos anti-K3 y anti-K12 y como controles negativos para los anticuerpos anti-K14 y anti-K15. Para verificar la especificidad los anticuerpos anti-ABCG2, anti-p63 y anti-S100A4 se utilizaron como controles positivos cultivos de la línea celular HT29-MXT, cortes de tejido de piel humana y cultivos primarios de fibroblastos limbares humanos, respectivamente. Por otro lado, se confirmó la especificidad de los marcadores de CMEL (K14, K15, ABCG2 y p63), de células epiteliales corneales diferenciadas (K3 y K12) y de fibroblastos (S100A4) en tejidos humanos de origen limbar y corneal tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm. Además,

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real revelaron que la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL K14 (72,38 veces), K15 (62,64 veces), ABCG2 (630 veces) y p63 α (16,64 veces) fue significativamente mayor en el epitelio limbar que en el epitelio corneal (K14 $p \leq 0,0005$; K15, ABCG2 y p63 α $p \leq 0,005$) (Figura 36A). Estos resultados fueron confirmados con los obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se observó que las proteínas K14 y K15 fueron expresadas en el citoplasma celular de todas las capas del epitelio limbar, mientras que no se expresaron en los cultivos de la línea celular HCE (control negativo). La proteína K15 no se expresó tampoco en el epitelio corneal, mientras que K14 sí que fue detectada en esta región (36B, C y D). Por otro lado, la proteína ABCG2 fue expresada tanto en el epitelio como en el estroma limbar, así como en los cultivos de la línea celular HT29-MXT (control positivo), pero no en la zona corneal (Figura 36B). La proteína p63 fue detectada solamente en el núcleo de las células de las capas más basales del epitelio limbar, así como en la epidermis humana (control positivo) (Figura 36B). En contraste, la expresión relativa de ARNm de los marcadores K3 (0,38 veces) y K12 (0,30 veces) fue significativamente menor en el epitelio limbar que en el epitelio corneal ($p \leq 0,005$ y $p \leq 0,0005$ respectivamente) (Figura 37A). De acuerdo con estos resultados, las proteínas K3 y K12 fueron expresadas en el citoplasma celular de todas las capas del epitelio corneal, así como en los cultivos de células HCE (control positivo), mientras que en la región limbar solo se expresó débilmente la proteína K12 en las capas más superficiales (Figura 37). La expresión relativa de ARNm del marcador S100A fue significativamente mayor en el estroma (330 veces) que en epitelio limbar ($p \leq 0,05$) (Figura 37A). La expresión proteica de S100A4 se detectó tanto en el estroma limbar como corneal, así como en los cultivos primarios de fibroblastos limbares humanos (control positivo) (Figura 37B).

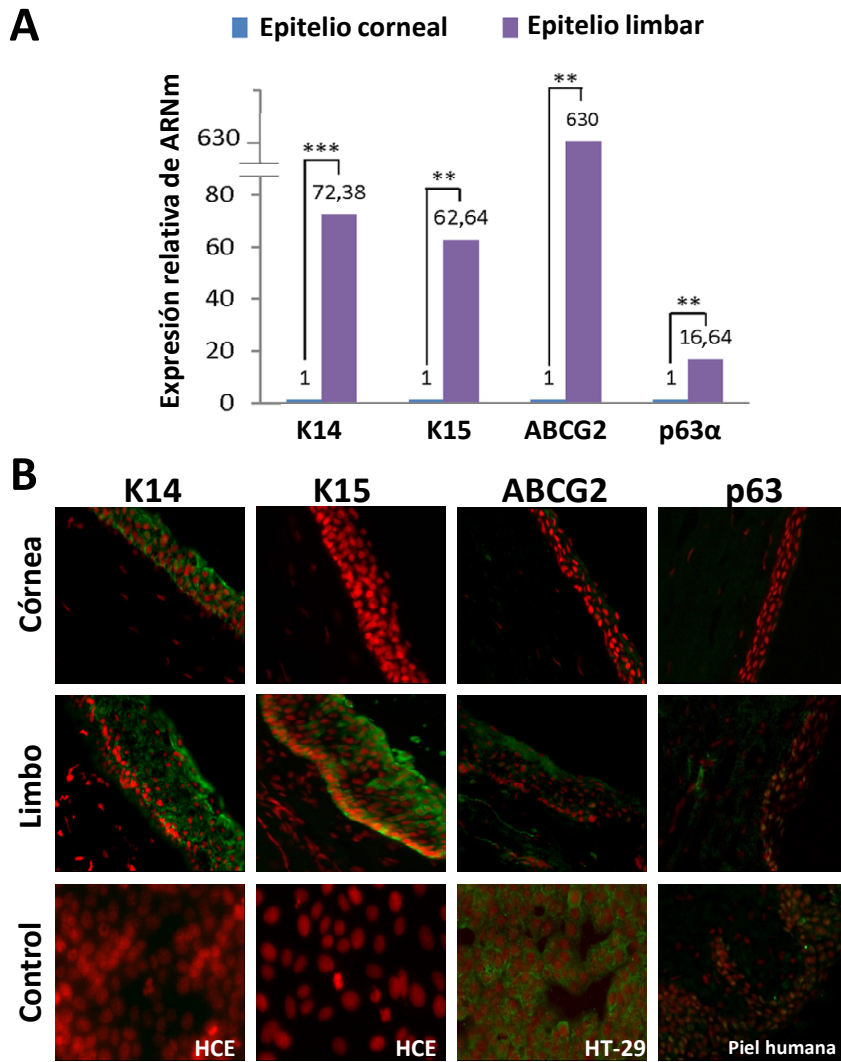


Figura 36. Validación de la expresión de los marcadores de células madre epiteliales limbares en la superficie ocular y validación de la especificidad de los anticuerpos utilizados en este trabajo. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 fue significativamente mayor en el epitelio limbar que en el epitelio corneal. (B) Los marcadores K15, ABCG2 y p63 se expresaron a nivel proteico solamente en la región limbar, mientras que K14 se expresó en el epitelio limbar y débilmente en el epitelio corneal. (B) Las proteínas K14 y K15 no fueron detectadas en los cultivos celulares de HCE (control negativo), mientras que las proteínas ABCG2 y p63 fueron detectadas en células HT-29 y cortes de piel humana, controles positivos respectivamente. Se muestra en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K14, K15 y ABCG2. La proteína p63 se visualiza en amarillo. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de fluorescencia, 40X aumentos. Los experimentos fueron realizados n=1. **p≤0,005; ***p≤0,0005.

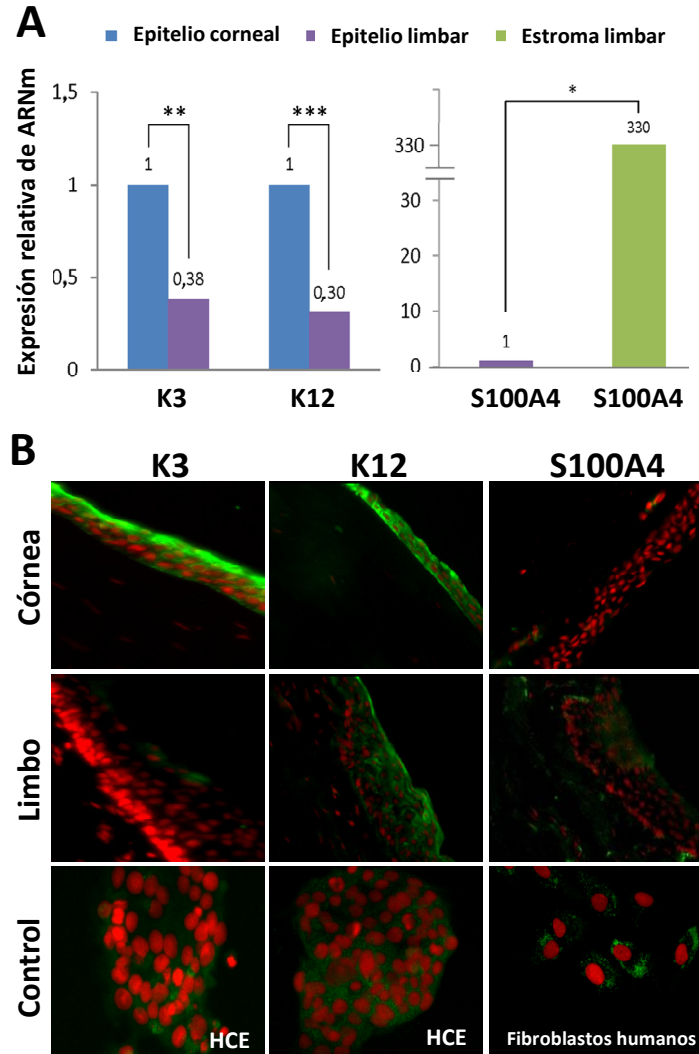


Figura 37. Validación de la expresión de los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas y del marcador específico de fibroblastos en la superficie ocular. Validación de la especificidad de los anticuerpos utilizados en este trabajo. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores K3 y K12 fue significativamente mayor en el epitelio corneal que en el epitelio limbar. (B) La proteína K3 se expresó solamente en el epitelio corneal, mientras que K12 se expresó en todas las capas celulares del epitelio corneal y solamente en las capas más superficiales del epitelio limbar. (B) Ambos marcadores se expresaron en las células HCE (control positivo). Por otro lado, (A) la expresión relativa de ARNm del marcador de fibroblastos S100A4 fue significativamente mayor en el estroma que en el epitelio limbar, (B) mientras que a nivel proteico se expresó tanto en el estroma corneal como en el limbar. (B) Se observó la expresión de la proteína S100A4 en los fibroblastos de limbo humano (control positivo). Se muestra en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K3, K12 y S100A4. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de fluorescencia, 40X aumentos. Los experimentos fueron realizados n=1. *p≤0,05; **p≤0,005; ***p≤0,0005.

Por otro lado, se validó también en tejidos limbares y corneales humanos la expresión de marcadores típicos de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c). Además, al igual que en los casos anteriores, se analizó la especificidad de los anticuerpos utilizados en este estudio para la detección de estas proteínas. Para ello, se utilizó tejido de amígdala humana como control positivo para los anticuerpos anti-PECAM y tejido de piel humana como control positivo para los anticuerpos anti-MART-1 y anti-CD11c. La expresión de la proteína PECAM fue detectada en el estroma limbar, mientras que las proteínas MART-1 y CD11c fueron observadas en el epitelio limbar, específicamente MART-1 en las capas más basales y CD11c en las capas intermedias. Ninguna de las proteínas mencionadas anteriormente fueron detectadas en los tejidos corneales, tal y como esperábamos (Figura 38). Estos marcadores se expresaron en los tejidos utilizados como controles positivos (Figura 38).

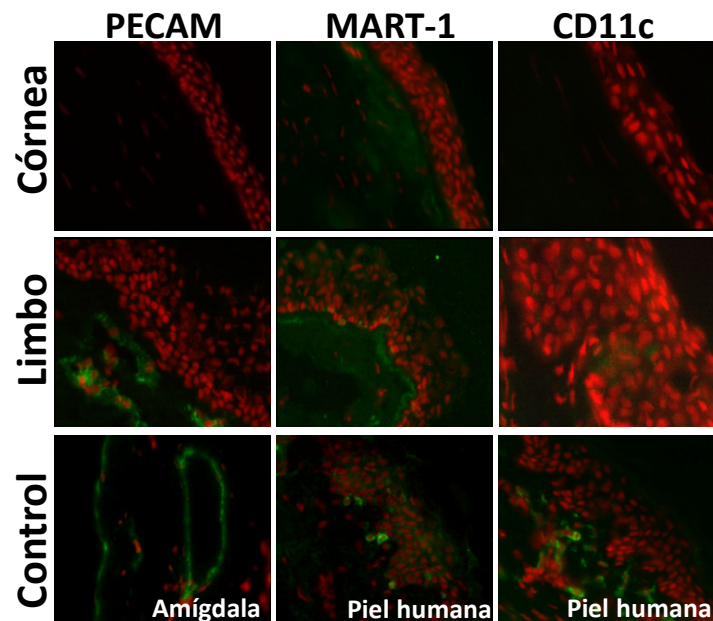


Figura 38. Análisis de la expresión de marcadores propios de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c) en tejidos de córnea y limbo. Validación de los anticuerpos utilizados en este trabajo. La presencia de la proteína PECAM no fue detectada en la región corneal de cortes histológicos de tejido humano, mientras que sí se detectó en la región limbar, concretamente en estroma limbar, así como en cortes de amígdala humana utilizados como control positivo. Las proteínas MART-1 y CD11C tampoco fueron expresadas en la región corneal, pero sí que se detectó su presencia en el epitelio corneal, específicamente en las capas basales e intermedias respectivamente. En ambos casos, las proteínas fueron detectadas en las muestras de piel humana utilizadas como controles positivos. Se muestra en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas PECAM, MART-1 y CD11c. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de fluorescencia, 40X aumentos. Los experimentos fueron realizados n=1.

OBJETIVO 1. Aumentar el número de CPLs disponibles mediante el desarrollo de un protocolo que permita establecer CPLs consecutivos, con un elevado porcentaje de CMEL, partir de una única biopsia limbar

Todo el abordaje de este objetivo se realizó utilizando el medio de cultivo IOBA-toxina colérica (Tabla 2), especialmente diseñado para el cultivo consecutivo de explantes limbares. Los tejidos limbares utilizados en este objetivo procedían de donantes con una edad media de $81,7 \pm 1,5$ (68–87) años y el tiempo transcurrido desde la obtención del tejido (enucleación) hasta su uso en el laboratorio fue de $3,2 \pm 0,3$ días.

1.1. Características de los cultivos primarios de epitelio limbar

1.1.1. Rendimiento de los cultivos primarios

El mismo explante limbar fue cultivado hasta seis veces consecutivas. Aunque, en ocasiones, la migración de células desde el tejido hacia el soporte de cultivo cesó en pases anteriores. El número total de explantes limbares sembrados en cada pase y el número de cultivos primarios confluentes obtenidos en cada caso se muestra en la tabla 8. El porcentaje de cultivos primarios confluentes obtenidos en cada uno de los pases aumentó desde CPL0 ($32,5 \% \pm 7,5\%$) hasta el CPL6 ($51,4\% \pm 20,9\%$), obteniendo el mayor porcentaje de cultivos confluentes en el CPL4 ($63,7\% \pm 12,4\%$). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 39A). La media de cultivos primarios confluentes obtenidos en el conjunto de todos los pases de explantes fue $49,8\% \pm 4,5\%$. Por otro lado, el tiempo transcurrido desde que se sembró el explante hasta que las células lo rodearon y fue levantado del soporte de cultivo, así como el tiempo necesario desde dicho momento hasta que el cultivo alcanzó confluencia fue diferente en cada pase (Figura 39B). De la misma forma, el tiempo total desde que se sembró el explante limbar hasta que el cultivo alcanzó confluencia aumentó desde $26,0 \pm 2,8$ días en el CPL0 hasta $35,5 \pm 7,1$ días en el CPL6, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 39B).

Tabla 8. Número de explantes limbares sembrados y número de cultivos primarios de limbo (CPLs) confluentes en cada pase. En la tabla se muestra el número de explantes limbares sembrados en cada pase, así como el número de donantes de los que proceden. Se indica también el número de CPLs confluentes obtenidos en cada pase.

	CPL0	CPL1	CPL2	CPL3	CPL4	CPL5	CPL6
Nº de donantes	13	11	11	10	8	7	6
Explantes limbares sembrados	190	66	48	26	19	16	13
Nº de CPLs confluentes	52	31	18	15	11	8	7

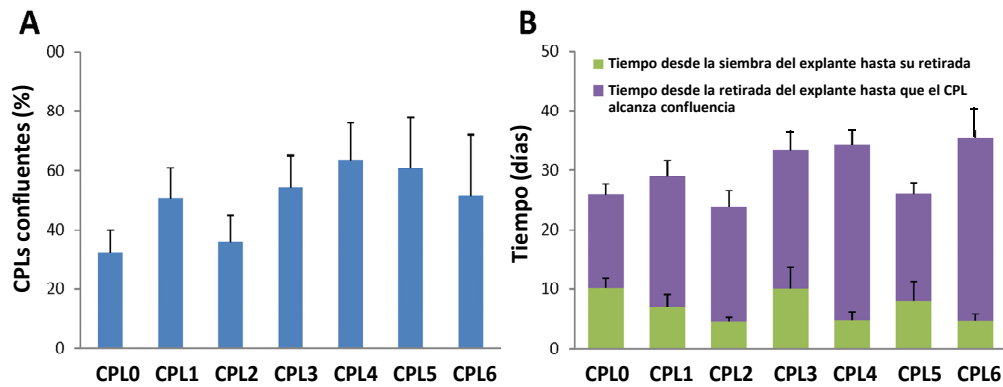


Figura 39. Rendimiento de los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de un único explante limbar. (A) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de CPLs que alcanzaron confluencia en los diferentes pases de los explantes. (B) No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que los CPLs de los diferentes pases de explantes tardaron en alcanzar confluencia.

1.1.2. Morfología y tamaño celular

La morfología y el tamaño celular de los CPLs fueron observados mediante microscopía óptica de contraste de fases. Se observaron diferencias entre los cultivos confluentes obtenidos a partir de los primeros pases y los últimos pases de los explantes. Las células de los CPL0, CPL1 y CPL2 mostraron una morfología poligonal homogénea, con un tamaño medio de 27 x 40 μm (Figura 40A y B). En el CPL4, la morfología celular empezó a ser más alargada, característica que empezó a observarse cuando las células comenzaron a migrar desde el tejido hacia la placa de cultivo y se manifestó de forma más acentuada cuando los cultivos alcanzaron confluencia. Ocasionalmente, esta variación en la morfología se observó en el CPL3. En los CPL5 y CPL6, se observó siempre una morfología celular totalmente alargada y que las células presentaban un tamaño medio de 18 x 200 μm (Figura 40A y B).

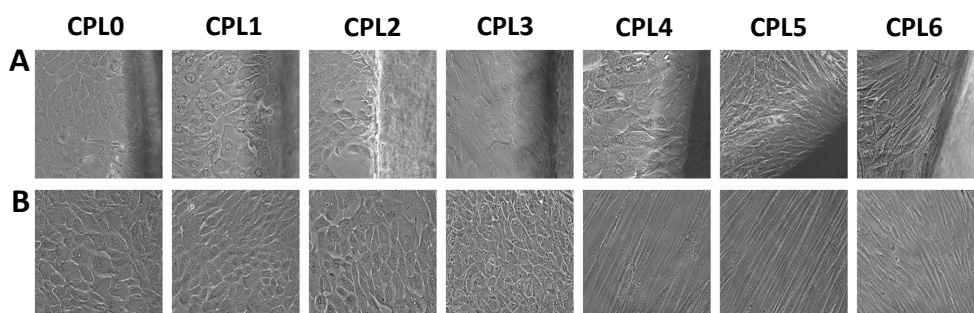


Figura 40. Morfología celular en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos de forma consecutiva a partir de un único explante limbar. (A) Imágenes representativas del inicio del crecimiento celular a partir de un explante limbar y (B) de los CPLs confluentes, tomadas en un microscopio invertido de contraste de fases, 20X aumentos. Las células presentaron morfología epitelial desde el CPL0 hasta el CPL3, donde la morfología de la población celular empezó a cambiar, siendo ésta totalmente alargada en los CPL5 y CPL6.

1.2. Caracterización de los CPLs consecutivos

1.2.1. Expresión de marcadores típicos de CMEL

La expresión de los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 fue analizada en cada uno de los CPLs obtenidos. Los niveles de expresión de ARNm en cada uno de los CPLs consecutivos fueron comparados con la expresión de ARNm en CPL0, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1. El número de experimentos realizados, tanto de RT-PCR a tiempo real como de inmunofluorescencia, se indican en la tabla 9.

La expresión relativa de ARNm para el marcador K14 aumentó cuatro veces desde el CPL0 hasta CPL2, aunque los cambios no fueron significativos. En el CPL3, la expresión de este marcador disminuyó (7×10^{-5} , $p \leq 0,01$) y permaneció muy baja hasta el CPL6. La expresión relativa del ARNm de K14 fue significativamente mayor en los CPL0-CPL2 que en los CPL3-CPL6 ($p \leq 0,05$) (Figura 41A). Por otro lado, el porcentaje de células positivas para la proteína K14 disminuyó desde el CPL0 ($59,3\% \pm 17,1\%$) hasta el CPL4 ($9,1\% \pm 5,5\%$) y no fue detectada en las células de los CPL5 y CPL6. De esta forma, el porcentaje de células que expresaron la proteína K14 fue significativamente mayor en los CPL0-CPL2 que en los CPL4-CPL6 ($p \leq 0,01$) (Figura 41E, 42A).

La expresión relativa de ARNm del el marcador K15 fue menor en el CPL1 (0,66 veces) y mayor en el CPL2 (1,15 veces) que en CPL0. En el CPL3, la expresión relativa de ARNm para este marcador fue solo de 0,008 veces, y permaneció muy baja en los cultivos consecutivos (Figura 41B). El porcentaje de células positivas para K15 fue de $24,1\% \pm 23,8\%$, $11,58\% \pm 11,58\%$ y $2,08\% \pm 2,08\%$ en los CPL0, CPL1 y CPL2, respectivamente. Sin

embargo, ninguna célula de los CPL4, CP5 y CPL6 expresó la proteína K15 (Figura 41F, 42B).

Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del marcador p63α aumentó desde el CPL0 hasta el CPL2 una media de dos veces, pero los cambios no fueron estadísticamente significativos. En el CPL3, esta expresión disminuyó hasta 0,003 veces ($p \leq 0,01$) y permaneció expresándose muy poco hasta el CPL6 (Figura 41C). El $34,2\% \pm 6,8\%$ de las células expresaron la proteína p63 en el CPL0, mientras que este porcentaje disminuyó hasta $3,8 \pm 3,8$ en el CPL2 ($p \leq 0,01$). La proteína p63 no fue detectada en los CPL3-CPL6 (Figura 41G, 42C).

Finalmente, la expresión relativa del marcador ABCG2 aumentó desde el CPL0 hasta el CPL3 (5,17 veces), disminuyendo en el CPL4 (1,43 veces). Desde el CPL4 hasta el CPL6 (3,26) la expresión relativa de esta marcador volvió a aumentar, aunque ninguno de estos cambios fue estadísticamente significativo (Figura 41D). El porcentaje de células positivas para la proteína ABCG2 fue mayor en todos los CPLs que en el CPL0 ($43\% \pm 10,4\%$), excepto en el CPL3 donde solamente el $6,8\% \pm 6,8\%$ de las células expresaron ABCG2 (Figura 41H, 42D).

En resumen, en los CPL0, CPL1 y CPL2 se detectó la expresión de todos los marcadores analizados, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, en los en los cuales no hubo diferencias significativas excepto para las proteínas p63 y ABCG2. En los CPL3 y CPL4 se detectaron cambios en la expresión de los marcadores típicos de CMEL, de tal forma que en los CPL5 y CPL6 la expresión proteica de estos marcadores no fue detectada.

Tabla 9. Número de cultivos primarios de limbo (CPLs) analizados. Número de CPLs procedentes de diferentes explantes y donantes analizados mediante RT-PCR a tiempo real e inmunofluorescencia.

CPLs	RT-PCR a tiempo real		Inmunofluorescencia	
	Explantes (n)	Donantes (n)	Explantes (n)	Donantes (n)
CPL0-CPL3	6	3	4	3
CPL4	4	3	4	3
CPL5	4	3	3*	3*
CPL6	3	2	3*	3*

*La expresión proteica de los marcadores ABCG2 y K12 no fue analizada mediante inmunofluorescencia en los CPL5 y CPL6 porque el número de muestras obtenidas no fue suficiente para realizar estos ensayos.

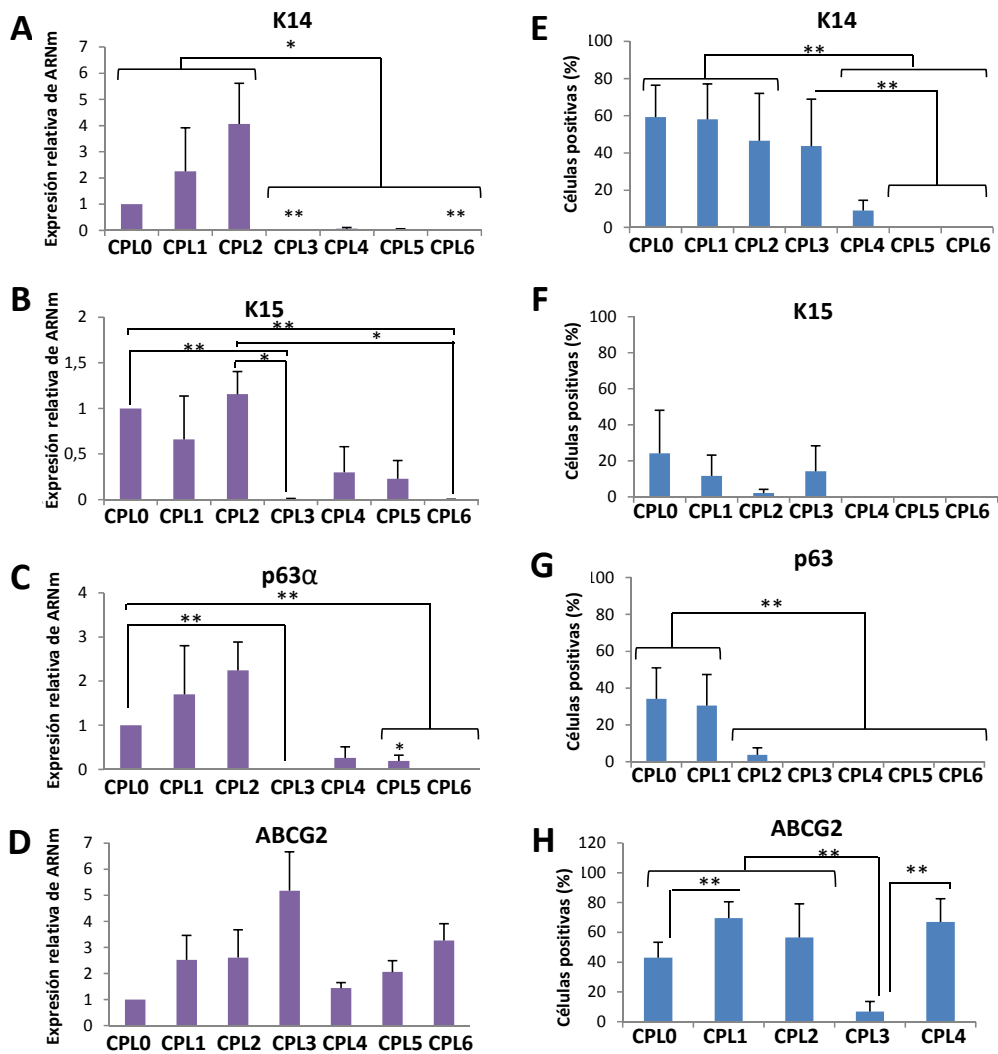


Figura 41. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos. Los resultados de RT-PCR a tiempo real mostraron que la expresión relativa de ARNm de los marcadores (A) K14, (B) K15 y (C) p63 fue mayor en los CPL0-CPL2 que en el CPL3, mientras que en el caso del marcador (D) ABCG2 no se produjo este cambio de expresión en el CPL3. El porcentaje de células que expresaban las proteínas (inmunofluorescencia) (E) K14, (F) K15 y (G) p63 tendió a disminuir desde el CPL0 hasta el CPL6. El porcentaje de células positivas para la proteína ABCG2 disminuyó desde el CPL0 hasta el CPL3 y aumentó de nuevo en el CPL4 (H). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

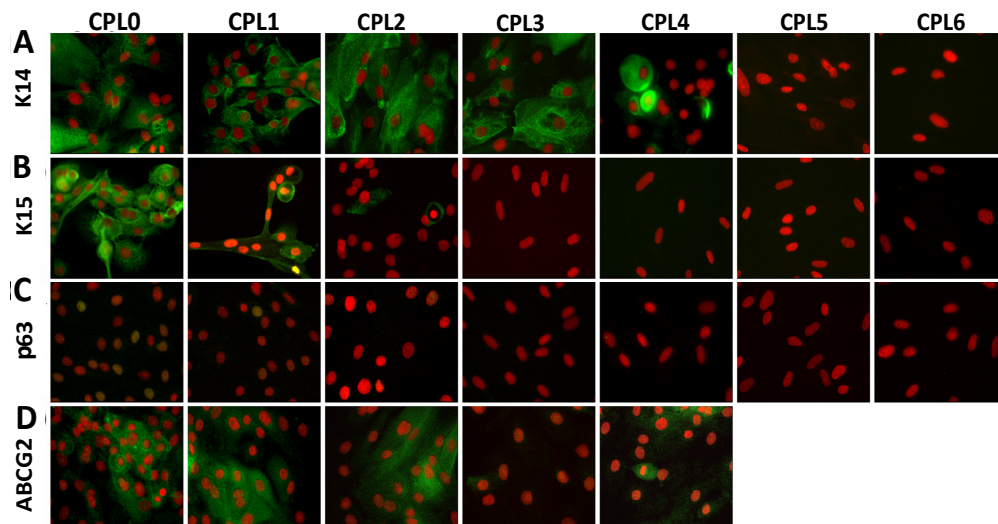


Figura 42. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos. El porcentaje de células que expresaban las proteínas (inmunofluorescencia) (A) K14, (B) K15 y (C) p63 tendió a disminuir desde el CPL0 hasta el CPL6. (D) El porcentaje de células positivas para la proteína ABCG2 disminuyó desde CPL0 hasta CPL3 y aumentó de nuevo en el CPL4. Se muestra en rojo los núcleos teñidos con ioduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K14, K15 y ABCG2. La proteína nuclear p63 se visualiza en amarillo. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico invertido de fluorescencia, 40X aumentos.

1.2.2. Expresión de marcadores específicos de células epiteliales corneales diferenciadas

La expresión de los marcadores K3 y K12 fue a analizada en cada uno de los CPLs consecutivos. Los niveles de expresión de ARNm en cada uno de ellos fueron comparados con la expresión en el CPL0, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1. El número de experimentos realizados tanto de RT-PCR a tiempo real como de inmunofluorescencia se indican en la tabla 8.

La expresión relativa de ARNm del marcador K3 fue menor en el CPL1 y el CPL2 (0,33 y 0,8 veces, respectivamente) que en el CLP0, aunque estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, la expresión de este marcador disminuyó de forma significativa en el CPL3 (0,03) y permaneció muy baja hasta el CPL6 (0,015 veces) (Figura 43A). Por otro lado, el porcentaje de células que expresaron el marcador K3 fue similar en todos los cultivos primarios, con una media de $59,2\% \pm 5,2\%$ de células positivas (Figura 43C y 44A).

La expresión relativa de ARNm del marcador K12 fue similar en el CPL1 y el CPL2, expresándose en ambos casos cinco veces más que en el CPL0; sin embargo, este incremento en la impresión no fue significativo. La expresión disminuyó de forma significativa en CPL3 (7×10^{-4} veces, $p \leq 0,01$) y permaneció alrededor de estos valores hasta el CPL6 (6×10^{-4} veces) (Figura 43B). Por otro lado, el porcentaje de células positivas para la proteína K12 aumentó desde un $28,3\% \pm 4,4\%$ en el CPL0 hasta, aproximadamente, un $40,5\% \pm 0,7\%$ en los CPL1 y CPL2. En el CPL3, solamente el $5,9\% \pm 3,5\%$ de las células expresaron este marcador, mientras que en el CPL4 un total de $74,4\% \pm 10,5\%$ expresaron K12 ($p \leq 0,01$) (Figura 43D y 44B).

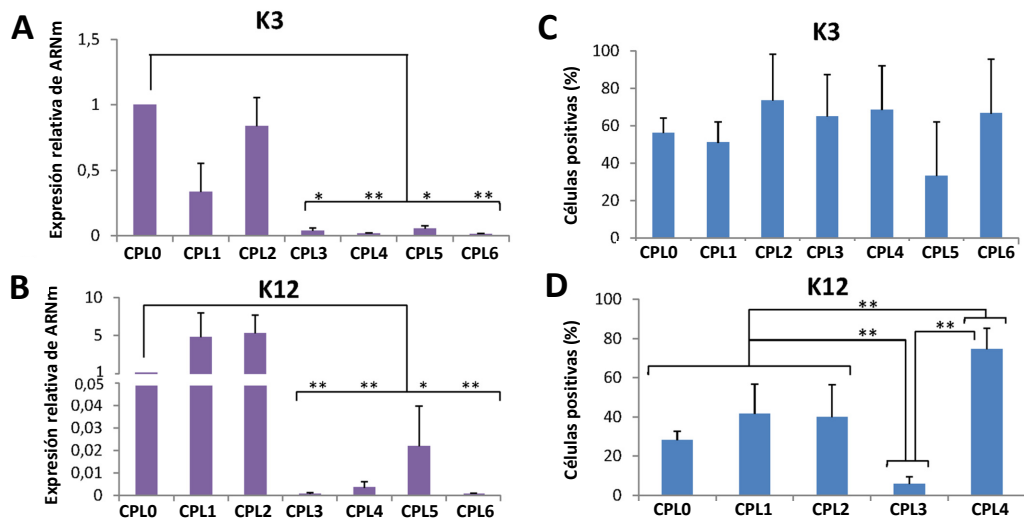


Figura 43. Expresión de marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos. Los resultados de RT-PCR a tiempo real mostraron que la expresión relativa de ARNm para los marcadores (A) K3 y (B) K12 fue menor en los CPL3-CPL6 que en CPL0-CPL2. El porcentaje de células que expresaban la proteína (inmunofluorescencia) (C) K3 no cambió entre los diferentes CPLs, mientras que el porcentaje de células que expresaron (D) K12 disminuyó significativamente en CPL3 y volvió a aumentar en CPL4. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

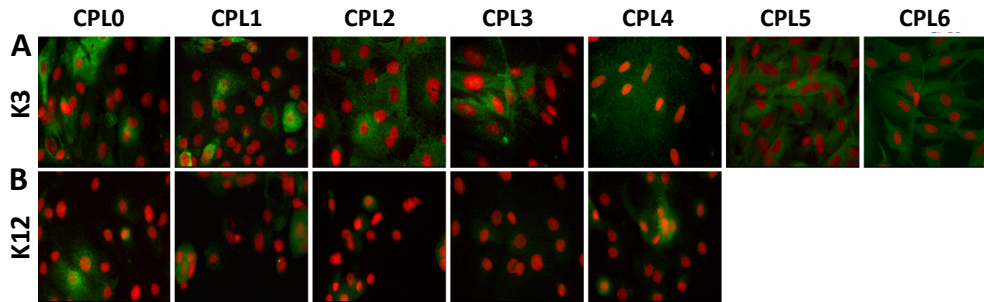


Figura 44. Expresión de marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos. El porcentaje de células que expresaron la proteína (inmunofluorescencia) (A) K3 no cambió entre los diferentes CPLs, mientras que el porcentaje de células que expresaron (B) K12 disminuyó significativamente en el CPL3 y volvió a aumentar en el CPL4. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K3 y K12. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia, a 40X aumentos.

1.2.3. Expresión del marcador de fibroblastos S100A4

Los niveles de expresión de ARNm en cada uno de los cultivos primarios consecutivos fue comparada con la expresión en el CPL0, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1. El número de experimentos realizados tanto de RT-PCR a tiempo real como de inmunofluorescencia se indican en la tabla 8.

El marcador de fibroblastos S100A4 se expresó tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm, en todos los CPLs. La expresión relativa de ARNm de este marcador fue significativamente ($p \leq 0,05$) menor en el CPL1 y en el CPL3 que en el CPL0 (Figura 45A), mientras que el porcentaje de células positivas fue significativamente menor en CPL0 ($p \leq 0,01$) que en todos los CPLs consecutivos. El mayor porcentaje de células expresando esta proteína se detectó en el CPL6, con un $96\% \pm 0,7\%$ de células positivas para S100A4 (Figura 45B y C).

1.3. Estudio histológico de los explantes limbares

Mediante la técnica de PAS-hematoxilina, se comprobó que los explantes limbares, antes de ser cultivados, presentaban en la región limbar un epitelio estratificado formado por cinco o seis capas celulares (Figura 46A). Por el contrario, después de ser cultivados seis veces consecutivas, no presentaban epitelio (Figura 46B). Además, se observó que el número de células en el estroma limbar disminuían a medida que se realizaban los diferentes pases y que la matriz extracelular se iba desorganizando (Figura 46B).

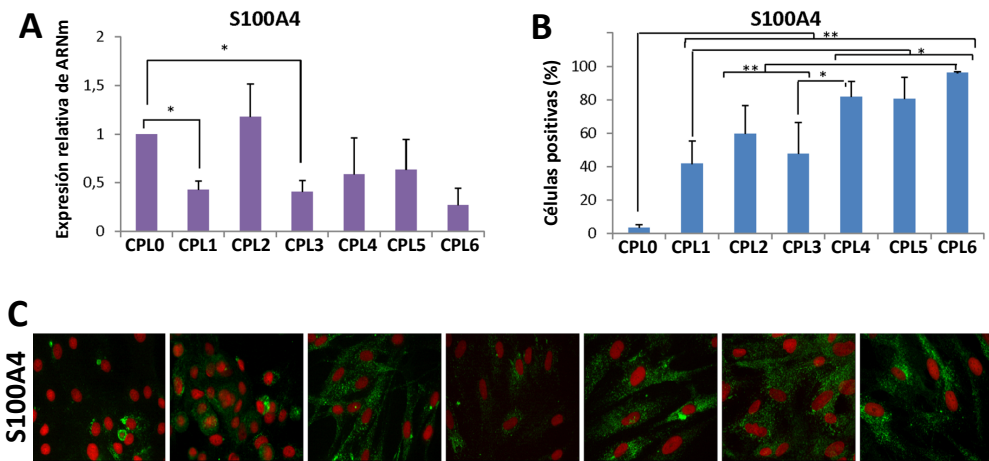


Figura 45. Expresión del marcador de fibroblastos (S100A4) en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos. (A) Los resultados de RT-PCR a tiempo real mostraron que la expresión relativa de ARNm del marcador S100A4 disminuyó desde el CPL0 al CPL6. (B y C) El porcentaje de células que expresaban esta proteína (inmunofluorescencia) fue significativamente menor en el CPL0 que en el resto de CPLs consecutivos. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de la proteína S100A4. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia, 40X aumentos.

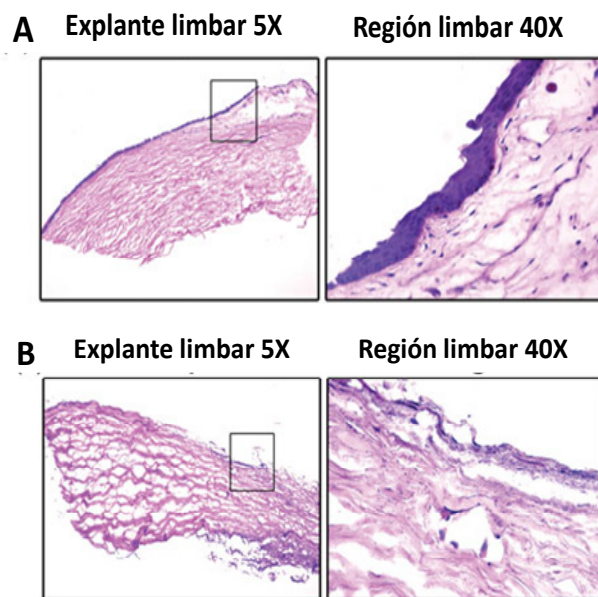


Figura 46. Análisis histológico de los explantes limbares antes y después de ser cultivados consecutivamente. La superficie de los explantes (A) antes de ser cultivados mostraba un epitelio limbar estratificado que desapareció (B) después de seis cultivos consecutivos del mismo explante. Imágenes representativas de tinción PAS-hematoxilina tomadas con un microscopio óptico de campo claro.

► Como resumen de los resultados obtenidos en el objetivo 1, se puede destacar que los tres primeros CPLs expandidos a partir de un mismo explante limbar (CPL0, CPL1 y CPL2) presentaban una población celular heterogénea, con células que expresaban marcadores propios de CMEL (K14, K15, ABCG2 y p63) y de células epiteliales corneales diferenciadas (K3 y K12), así como el marcador específico de fibroblastos (S100A4). Además, las células de dichos cultivos presentaban una morfología poligonal, típica de células epiteliales. Sin embargo, en los CPL3 y CPL4 las células comenzaron a adquirir una morfología alargada y la presencia de células positivas para los marcadores de CMEL disminuyó, mientras que el porcentaje de células positivas para los marcadores propios de células epiteliales corneales diferenciadas y para el marcador de fibroblastos aumentó.

OBJETIVO 2. Obtener CPLs con una población rica en CMELs utilizando un medio de cultivo carente de componentes de origen animal y de compuestos potencialmente nocivos.

Los tejidos limbares utilizados en este objetivo procedían de donantes con una edad media de $80,8 \pm 2,4$ (60–97) años y el tiempo transcurrido desde la obtención del tejido (enucleación) hasta su uso en el laboratorio fue de $3,0 \pm 0,3$ días. Los CPLs obtenidos en este objetivo fueron establecidos en todos los casos a partir de explantes limbares.

2.1. Determinación de la composición de un medio de cultivo carente de componentes de origen animal y de compuestos potencialmente nocivos

Con el fin de analizar y comparar los medios de cultivo utilizados por los diferentes autores para la expansión *in vitro* de CMEL, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica. Como componentes comunes en la mayoría de los artículos publicados se encontró el medio base DMEM/F12 suplementado con EGF, insulina, transferrina, selenio, hidrocortisona, toxina colérica, DMSO, suero sanguíneo y antibióticos. En base a estos hallazgos, en esta tesis doctoral se propuso, como principal cambio en la composición del medio de cultivo, la sustitución de la toxina colérica y del FBS por isoproterenol y SH, respectivamente, a la vez que el DMSO era reemplazado por transferrina-selenio, estableciendo de este modo un nuevo medio de cultivo (IOBA-SH) libre de compuestos de origen animal y de componentes potencialmente nocivos. La composición específica del medio IOBA-SH aparece detallada en la tabla 2.

2.2. Características de los CPLs obtenidos con los diferentes medios de cultivo

2.2.1. Análisis del rendimiento de los CPLs

Con los tres medios de cultivo testados (CnT20, IOBA-FBS e IOBA-SH) se obtuvieron CPLs confluentes. Sin embargo el porcentaje de CPLs confluentes obtenido fue mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH ($29,0\% \pm 8,8\%$) que cuando se utilizaron los medios IOBA-FBS ($25,9\% \pm 5,0\%$) y CnT20 ($18,9\% \pm 5,6\%$). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Figura 47A). No hubo tampoco diferencias significativas en el tiempo transcurrido desde que sembró el explante limbar hasta que los cultivos alcanzaron confluencia, siendo este tiempo muy similar en los tres casos (Figura 47B). El número total de explantes procedentes de diferentes donantes que fueron sembrados con cada medio de cultivo se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Número de explantes limbares sembrados con cada medio de cultivo. En la tabla se muestran el número de explantes limbares sembrados con cada medio de cultivo, así como el número de donantes de los que procedían dichos explantes.

	CnT20	IOBA-FBS	IOBA-SH
Nº de donantes	11	8	10
Explantes limbares sembrados	122	82	107

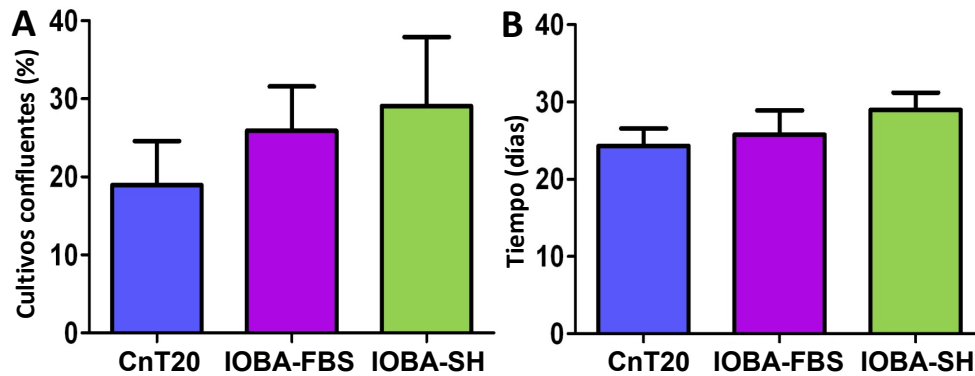


Figura 47. Rendimiento de los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos con los diferentes medios de cultivo testados. (A) El porcentaje de cultivos primarios confluentes obtenido fue mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH que cuando se utilizaron los medios IOBA-FBS y CnT20, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (B) No hubo tampoco diferencias significativas en el tiempo transcurrido desde que se sembraron los explante limbares hasta que los cultivos alcanzaron el estado de confluencia, aunque los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH fueron los que más tiempo necesitaron para alcanzar dicho estado.

2.2.2. Análisis de la morfología y el tamaño celular

Todos los cultivos primarios obtenidos, independientemente del medio de cultivo utilizado, presentaron una población celular homogénea, con células que presentaban una morfología poligonal, con un tamaño celular medio de 28 x 50 μm (Figura 48). En ocasiones, las células obtenidas a partir de los explantes presentaron una morfología alargada y un tamaño celular mayor. Este hecho fue también independiente del medio de cultivo utilizado para su cultivo.

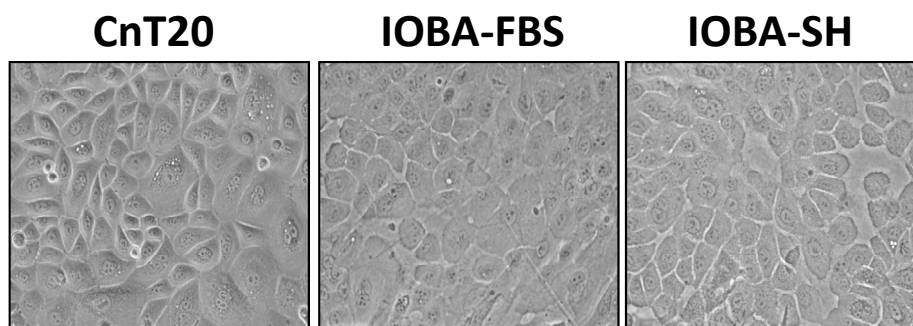


Figura 48. Morfología celular en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos con diferentes medios de cultivo. Imágenes representativas de los CPLs confluentes, obtenidas en un microscopio óptico invertido de contraste de fases, 20X aumentos. Las células presentaron morfología poligonal con los tres medios de cultivo. Además, el tamaño celular fue similar en los tres casos.

2.3. Caracterización de los CPLs

Para la realización de la caracterización celular, se analizaron cuatro cultivos primarios obtenidos de cuatro explantes distintos procedentes de al menos tres donantes diferentes ($n=4$) mediante la técnica de inmunofluorescencia y seis cultivos primarios obtenidos de 6 explantes distintos procedentes de al menos tres donantes diferentes ($n=6$) mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real.

2.3.1. Expresión de marcadores típicos de CMEL

La expresión de los marcadores específicos de CMELs K14, K15, ABCG2 y p63 fue determinada tanto a nivel proteico (inmunofluorescencia) como a nivel de ARNm (RT-PCR a tiempo real) en los cultivos primarios obtenidos con los diferentes medios de cultivo. Los niveles de expresión de ARNm en los cultivos incubados con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH fue comparada con la expresión en los CPLs expandidos con CnT20 (utilizado como calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del marcador K14 fue significativamente mayor en los cultivos primarios incubados con CnT20 que con IOBA-FBS (0,11 veces) e IOBA-SH (0,10 veces) ($p \leq 0,001$), en los que la expresión relativa de este marcador fue similar (Figura 49A). Sin embargo, el porcentaje de células que expresaron la proteína K14 fue menor cuando se utilizó el medio de cultivo CnT20 ($24,7\% \pm 19,7\%$) que cuando se utilizaron los medios IOBA-FBS ($30,6\% \pm 17,8\%$) e IOBA-SH ($39,7\% \pm 22,7\%$), aunque sin diferencias significativas. Por otro lado, el porcentaje de células positivas para este marcador fue similar cuando se

utilizaron los medios IOBA-FBS ($30,6\% \pm 17,8\%$) e IOBA-SH ($39,7\% \pm 22,6\%$) (Figura 49B y 50).

La expresión relativa de ARNm del marcador K15 en los cultivos primario obtenidos con IOBA-SH (5,38 veces) fue significativamente mayor que cuando se utilizó el medio control CnT20 ($p \leq 0,05$). Sin embargo, la expresión fue similar entre los cultivos incubados con IOBA-SH e IOBA-FBS (5,80 veces) (Figura 49A). En el único caso en el que se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para un marcador de CMEL fue en análisis del marcador K15. El porcentaje de células que expresaron la proteína K15 fue significativamente mayor en los cultivos primarios incubados con el medio IOBA-SH ($13,5\% \pm 11,4\%$, $p \leq 0,05$) que con el medio IOBA-FBS, donde esta proteína no fue detectada (Figura 49B y 50).

La expresión relativa de ARNm fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos con el medio control CnT20 que con los medios IOBA-FBS (0,10 veces) e IOBA-SH (0,06 veces) ($p \leq 0,001$, Figura 49A). Sin embargo, el porcentaje de células positivas para la proteína ABCG2 fue de $16,5\% \pm 6,3\%$ en los cultivos incubados con el medio control CnT20, de $12,0\% \pm 6,6\%$ con el medio IOBA-FBS y de $22,5\% \pm 13,9\%$ con IOBA-SH, sin diferencias significativas (Figura 49B y 50).

Finalmente, se analizó la expresión del marcador p63. El patrón de la expresión relativa de ARNm del marcador p63 α fue similar que el de los marcadores K14 y ABCG2. Se observó mayor expresión relativa de ARNm de este marcador en los cultivos obtenidos con medio CnT20 que en los cultivos incubados con IOBA-FBS (0,13 veces) o IOBA-SH (0,14 veces), entre los cuales la expresión fue similar (Figura 49A). Por otro lado, el porcentaje de células positivas para este marcador fue menor cuando se utilizó el medio de cultivo CnT20 ($0,4\% \pm 0,4\%$) que cuando se utilizaron los medios IOBA-FBS ($11,2 \pm 10,3$) e IOBA-SH ($11,0 \pm 11,0$), aunque estas diferencias no fueron significativas. (Figuras 49B y 50).

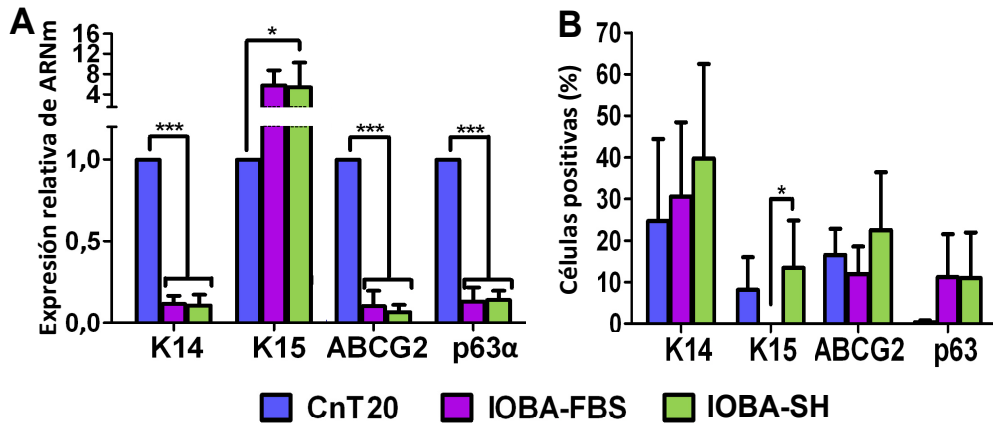


Figura 49. Expresión de marcadores propios de CMEL en los cultivos primarios de limbo (CPLs) incubados con diferentes medios de cultivo. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores K14, ABCG2 y p63α fue mayor en los CPLs incubados con el medio CnT20. (B) Por el contrario, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para dichos marcadores. El marcador K15 se expresó tanto a nivel proteico como de ARNm de forma significativamente mayor en los cultivos obtenidos con el medio IOBA-SH (A y B). *p≤0,05, ***p≤0,001.

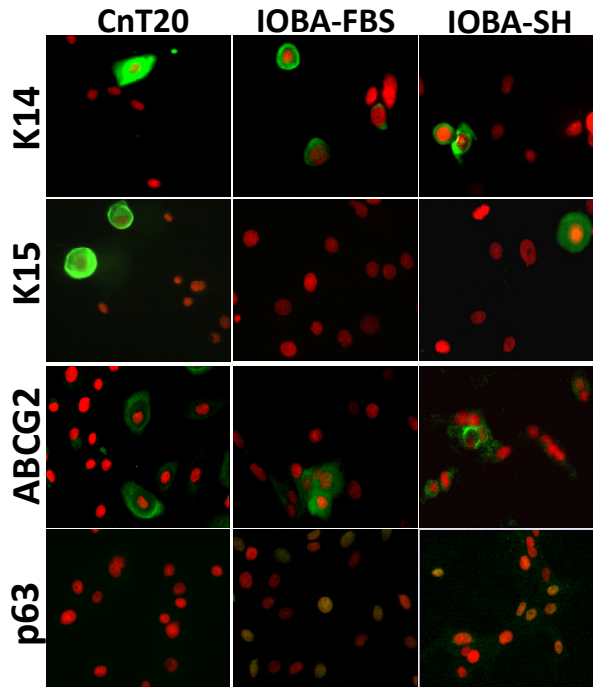


Figura 50. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares (CMEL) en los cultivos primarios de limbo (CPLs) incubados con diferentes medios de cultivo. El porcentaje de células que expresaron las proteínas K14 y ABCG2 fue similar con los tres medios de cultivo, mientras que K15 y p63 se expresaron menos en los cultivos primarios incubados con los medios IOBA-FBS y CnT20, respectivamente. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con ioduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K14, K15 y ABCG2. La proteína nuclear p63 se visualiza en amarillo. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

2.3.2. Expresión de marcadores típicos de células epiteliales corneales diferenciadas

La expresión de los marcadores K3 y K12 fue analizada en los cultivos primarios obtenidos con los diferentes medios de cultivo. La expresión de ARNm en los cultivos incubados con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH fue comparada con la expresión en los cultivos expandidos con CnT20 (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del marcador K3 fue significativamente mayor cuando los cultivos fueron incubados con el medio CnT20 que con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH ($p \leq 0,001$). La expresión de ARNm fue similar en los CPLs cultivados con el medio IOBA-FBS e IOBA-SH, con una media de 0,003 veces superior a la expresión en los CPLs cultivados con el medio CnT20 (Figura 51A). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para la proteína K3 entre los cultivos obtenidos con el medio CnT20 ($40,9\% \pm 14,1\%$), IOBA-FBS ($52,5\% \pm 8,7\%$) e IOBA-SH ($68,5\% \pm 8,7\%$) (Figuras 51B y 52).

No observaron diferencias significativas en la expresión relativa de ARNm del marcador K12, aunque fue menor en los cultivos incubados con el medio CnT20 que los con los medios IOBA-FBS (7,47 veces) e IOBA-SH (17,45 veces) (Figura 51A). Siguiendo un patrón de expresión similar a la proteína K3, el porcentaje de células positivas para K12 fue similar, independientemente del medio de cultivo utilizado ($13,8\% \pm 9,8\%$ con CnT20, $17,9\% \pm 9,2\%$ con IOBA-FBS y $27,1\% \pm 13,6\%$ con IOBA-SH) (Figuras 51B y 52).

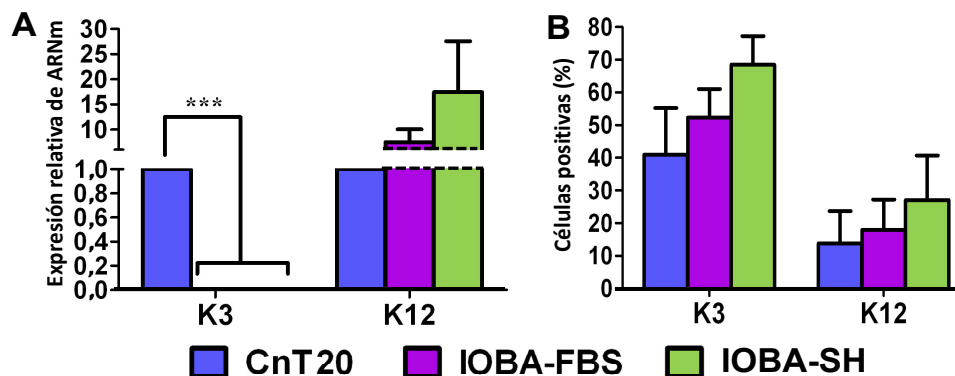


Figura 51. Expresión de marcadores propios de células epiteliales corneales diferenciadas en los cultivos primarios de limbo (CPL) incubados con diferentes medios de cultivo. (A) La expresión relativa de ARNm de K3 fue significativamente mayor cuando los CPLs fueron incubados con el medio CnT20, mientras que la expresión relativa de ARNm del marcador K12 fue similar con los tres medios de cultivo. (B) Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para las proteínas K3 y K12. *** $p \leq 0,001$.

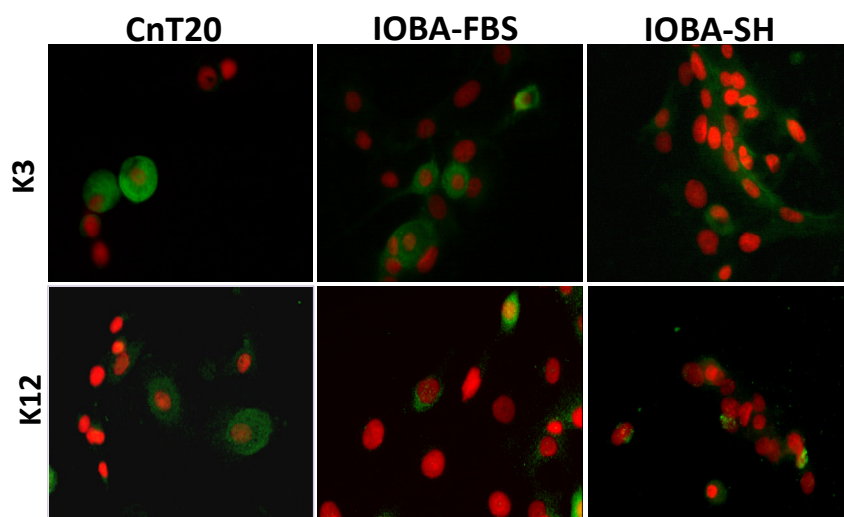


Figura 52. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) incubados con diferentes medios de cultivo. La expresión de las proteínas K3 y K12 fue similar, independientemente del medio de cultivo. La proteína K3 se expresó más en los cultivos obtenidos con los tres medios de cultivo que la proteína K12. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con ioduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K3 y K12. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

2.3.3. Expresión de marcadores específicos de células de estirpe no epiteliales.

En este caso, la expresión relativa de ARNm para el del marcador S100A4 en los cultivos obtenidos con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH fue comparada con la expresión en los cultivos incubados con el medio control CnT20, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

Las células incubadas con los tres medios de cultivo expresaron ARNm específico para S100A4, encontrando mayor cantidad cuando se utilizó el medio de cultivo IOBA-SH (1,94 veces), aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 53A). Por otro lado, el mayor porcentaje de célula positivas para este marcador se observó en los cultivos obtenidos con el medio CnT20 ($33,6\% \pm 11,4\%$), mientras que el menor porcentaje fue detectado cuando se utilizó el medio IOBA-SH ($16,2\% \pm 8,5\%$), aunque estas diferencias no fueron significativas (Figura 53B y C).

La expresión de marcadores propios de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1), células dendríticas (CD11c) y fibroblastos (S100A4) fue analizada a nivel proteico, para poder determinar la posible presencia de estos linajes celulares en los cultivos primarios

obtenidos con los distintos medios de cultivo analizados. No fue detectada la presencia de células que expresasen las proteínas PECAM; MART-1 y CD11c en los cultivos obtenidos, independientemente del medio de cultivo utilizado (Figura 53C).

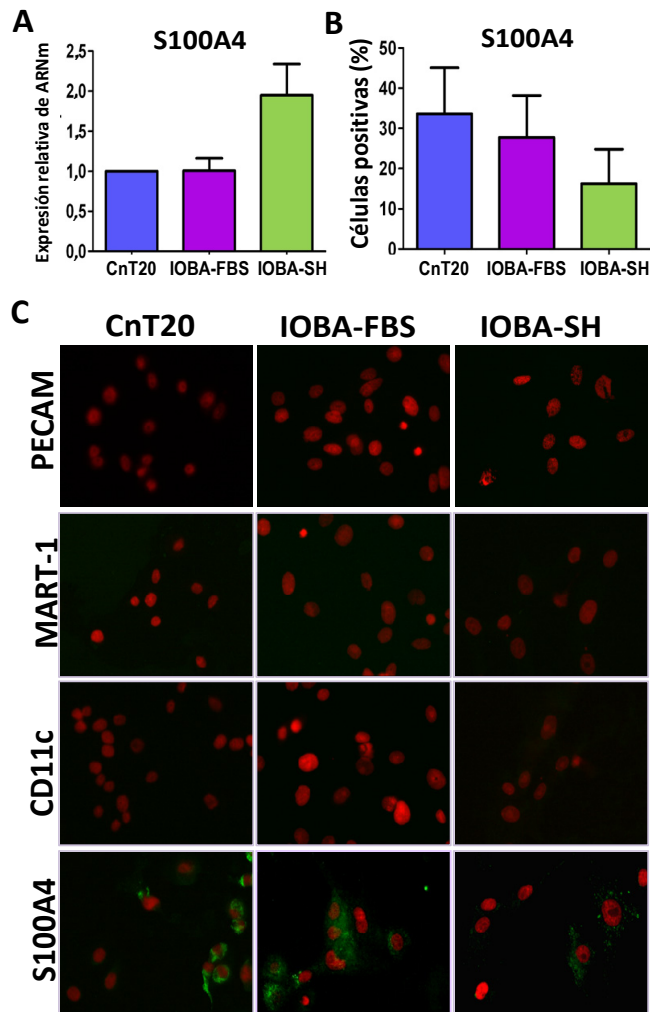


Figura 53. Expresión de marcadores específicos de células de estirpe no epitelial en los cultivos primarios de limbo (CPLs). (A) El marcador S100A4 fue detectado a nivel de ARNm cuando los tres medios de cultivo fueron utilizados, expresándose más en los cultivos incubados con el medio IOBA-SH, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. (B) Además, esta proteína fue detectada en los CPLs incubados con los tres medios de cultivo. Por el contrario, el porcentaje de células positivas para el marcador S100A4 fue mayor en los CPLs cultivados con CnT20, aunque también sin diferencias significativas. (C) Por otro lado, los marcadores específicos de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c) no fueron detectados a nivel proteico en los diferentes CPLs, independientemente del medio de cultivo utilizado. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas PECAM, MART-1, DC11c y S100A4. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

► En resumen, los CPLs incubados con los medios de cultivo CnT20, IOBA-FBS e IOBA-SH presentaron una población celular que presentaba de forma mayoritaria una morfología celular poligonal sin diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para los marcadores propios de CMEL (K14, ABCG2 y p63), así como para los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas (K y K12). Por el contrario, la expresión relativa de ARNm para todos los marcadores analizados fue significativamente mayor en los CPLs incubados con el medio CnT20, excepto para los marcadores K12 y K15. La expresión del marcador específico de CMEL K15 fue significativamente mayor en los PCLs incubados con el medio IOBA-SH. Las proteínas propias de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c) no fueron detectadas en ningún CPLs. Sin embargo, la proteína S100A4 fue expresada en los CPLs incubados con los tres medios de cultivo.

Con estos resultados, se puede afirmar que los CPLs obtenidos con el medio de cultivo IOBA-SH tienen un patrón de expresión proteico similar que cuando se usa el medio de cultivo CnT20 o, al menos, que este patrón de expresión no pone de manifiesto que las células de los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH están más diferenciadas que con el medio CnT20. Este hecho, junto con la composición conocida del medio IOBA-SH, sin suero de origen animal ni compuestos potencialmente nocivos, nos hizo plantearnos que el medio de cultivo IOBA-SH era mejor candidato frente al medio de cultivo CnT20 para el cultivo consecutivo de explantes limbares manteniendo la bioseguridad de los CPLs obtenidos.

2.4. Expansión consecutiva de explantes limbares siguiendo el protocolo establecido en el objetivo 1 y utilizando el medio de cultivo IOBA-SH

2.4.1. Análisis del rendimiento de los CPLs

El mismo explante limbar fue cultivado tres veces consecutivas con el medio de cultivo IOBA-SH, obteniendo cultivos primarios limbares confluentes en los tres pases. El número de explantes sembrados, procedentes de diferentes donantes, en cada uno de los pases y el número de CPLs confluentes obtenidos están detallados en la tabla 11. El porcentaje de cultivos primarios confluentes aumentó significativamente del CPL0 (29,0% \pm 8,8%) al CPL1 (85,9% \pm 6,8%) ($p \leq 0,01$), mientras que disminuyó de nuevo, aunque de forma no significativa en el CPL2 (60,6% \pm 15,2%) (Figura 54A). Por otra lado, el tiempo transcurrido desde que se sembró el explante hasta que las células lo rodearon y se levantó del soporte de cultivo fue significativamente mayor en el CPL0 (14,5 \pm 1,4 días) que en los CPL1 (6,4 \pm 1,4 días) y CPL2 (8,28 \pm 1,4 días). De la misma forma, el tiempo total desde que se sembró el explante limbar hasta que los cultivos alcanzaron confluencia fue significativamente mayor en el CPL0 (28,9 \pm 2,2 días) que en los CPL1 (17,1 \pm 1,4 días) y CPL2 (16,9 \pm 1,6 días) ($p \leq 0,001$), donde este valor fue similar (Figura 54B).

Tabla 11. Número de explantes limbares sembrados en cada pase consecutivo con el medio IOBA-SH. En la tabla se muestra el número de explantes limbares sembrados en cada pase, así como el número de donantes de los que procedían. Se indica también el número de cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos en cada pase.

	CPL0	CPL1	CPL2
Nº de donantes	10	7	6
Explantes limbares sembrados	107	41	33
CPLs confluentes	39	33	21

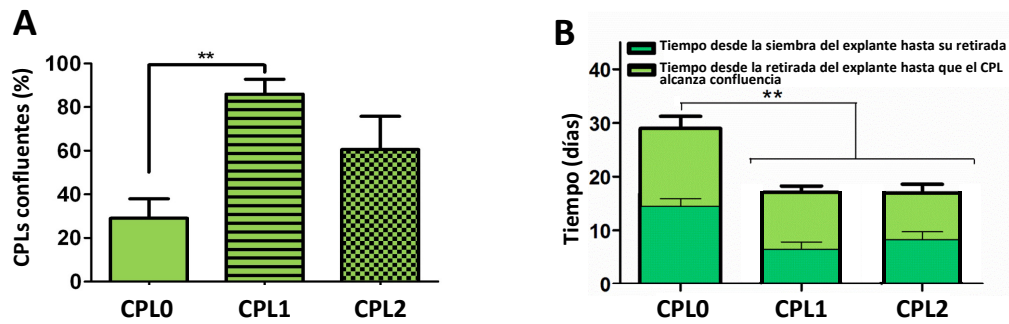


Figura 54. Rendimiento de los cultivos primarios de limbo (CPL) obtenidos a partir de un único explante limbar con el medio de cultivo IOBA-SH. (A) El porcentaje de CPLs confluentes aumentó significativamente del CPL0 al CPL1, mientras que disminuyó de nuevo, aunque de forma no significativa en el CPL2. (B) Por otro lado, el tiempo transcurrido desde la siembra del explante hasta que los CPLs alcanzaron confluencia fue significativamente mayor en el CPL0 que en los CPL1-CPL2. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

2.4.2. Morfología y tamaño celular

Los CPLs obtenidos a partir del primer y segundo pase de los explantes limbares (CPL0 y CPL1) presentaron una población celular con morfología poligonal y homogénea. Generalmente, estas características morfológicas permanecieron también durante el CPL2, aunque en ocasiones se pudo apreciar una morfología más alargada y un tamaño celular mayor que en los cultivos anteriores (Figura 55).

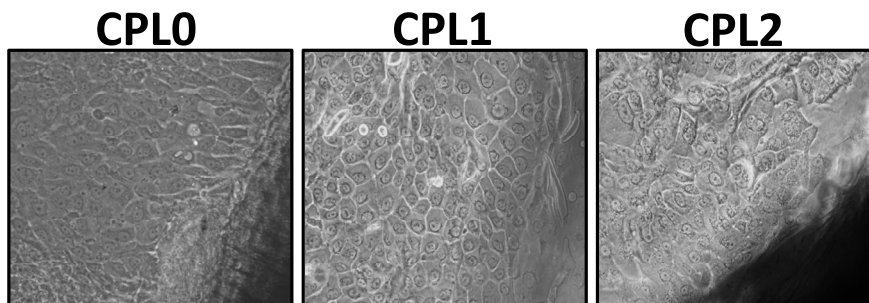


Figura 55. Morfología celular en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos de forma consecutiva con el medio IOBA-SH. Imágenes representativas de CPLs confluentes, tomadas en un microscopio óptico invertido de contraste de fases, 20X aumentos. Las células presentaron morfología poligonal en los dos primeros cultivos primarios obtenidos de forma consecutiva. Generalmente, estas características morfológicas permanecieron durante el CPL2, aunque en ocasiones se pudo apreciar una morfología más alargada y un tamaño celular mayor que en los cultivos anteriores.

2.4.3. Caracterización de los CPLs consecutivos

Para realizar de la caracterización celular, se analizaron cuatro CPLs obtenidos de cuatro explantes distintos procedentes de, al menos, tres donantes diferentes (n=4) mediante la técnica de inmunofluorescencia y seis cultivos primarios obtenidos de seis explantes distintos procedentes de al menos tres donantes diferentes (n=6) mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real.

Expresión de marcadores propios de CMEL

La expresión de los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 fue analizada en los CPLs a nivel proteico mediante inmunofluorescencia y a nivel de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real. Los niveles de expresión ARNm en cada uno de los CPLs consecutivos fue comparada con la expresión en el CPL0 (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del marcador K14 ligeramente levemente desde el CLP0 hasta el CLP1 (1,3 veces) para volver a disminuir, esta vez de forma significativa, en el CLP2 (0,07 veces) ($p \leq 0,05$ o $p \leq 0,001$) (Figura 56A). Sin embargo, el porcentaje de células que expresaron esta proteína fue similar en todos los cultivos consecutivos, con una media del $37,8\% \pm 2,3\%$ (Figuras 56B y 57).

Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del marcador K15 fue similar en el CPL0 y el CPL1 (1,08 veces), mientras que disminuyó significativamente en el CPL2 (0,04 veces) ($p \leq 0,05$) (Figura 56A). Siguiendo un patrón de expresión similar, el porcentaje de células positivas para esta proteína aumentó ligeramente desde el CPL0 ($13,5\% \pm 11,4\%$) hasta el CPL1 ($29,4\% \pm 17\%$) sin diferencias significativas y disminuyó de forma significativa en el CPL2 ($p \leq 0,05$) (Figura 56B y 57).

Con un patrón de expresión diferente, la expresión relativa de ARNm del marcador ABCG2 disminuyó desde el CPL0 hasta el CPL1 (0,70 veces) y volvió a aumentar en el CPL2 (1,65 veces) (Figura 56A), aunque sin cambios estadísticamente significativos. La proteína ABCG2 se detectó en el $22,5\% \pm 13,9\%$ de las células en el CPL0. Este porcentaje aumentó significativamente en CPL1 ($94,7\% \pm 2,0\%$, $p \leq 0,05$) y disminuyó de nuevo de forma significativa en CPL2 ($58,3\% \pm 21,4\%$, $p \leq 0,05$), aunque este porcentaje continuó siendo significativamente mayor que el detectado en el CPL0 (Figuras 56B y 57).

Finalmente se analizó la expresión del marcador p63. La expresión relativa de ARNm del marcador p63 α disminuyó de forma significativa primero del CPL0 al CPL1 y luego hasta el CPL2 (0,006 veces) ($p \leq 0,05$ o $p \leq 0,001$) (Figura 56A). Además, la expresión de esta proteína solo fue detectada en el CPL0 ($11,0\% \pm 11,0\%$) (Figuras 56B y 57).

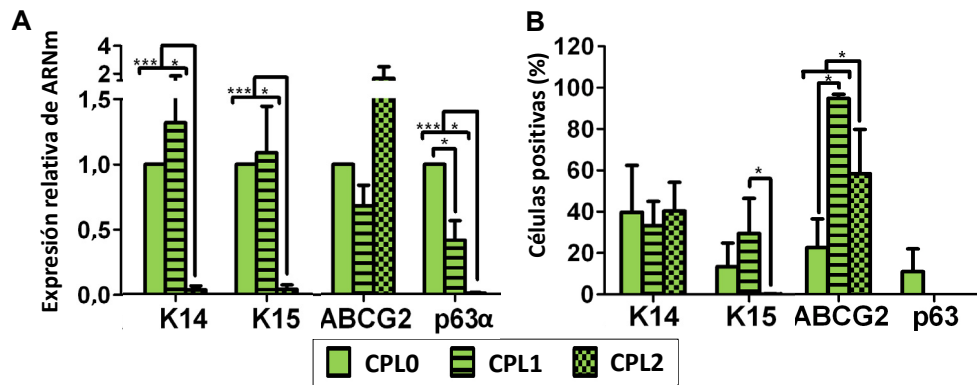


Figura 56. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos obtenidos con el medio IOBA-SH. (A) Los resultados de RT-PCR a tiempo real mostraron que la expresión relativa de ARNm de los marcadores K14, K15 y p63α disminuyó significativamente en el CPL2, mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión relativa del marcador ABCG2. (B) El porcentaje de células que expresó la proteína (inmunofluorescencia) K14 fue similar en todos los CPLs consecutivos, mientras que el porcentaje de células expresando K15 y ABCG2 disminuyó significativamente en el CPL2. La proteína p63 solo fue detectada en el CPL0. *p≤0,05; ***p≤0,001.

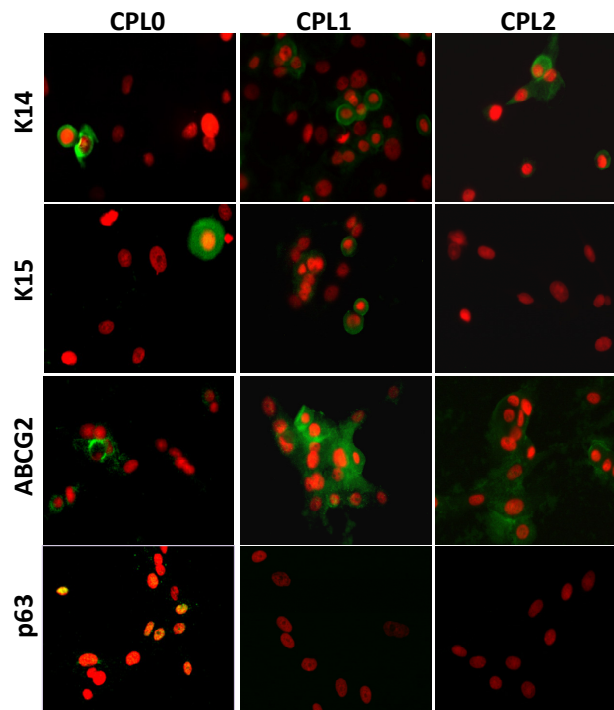


Figura 57. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos obtenidos con el medio IOBA-SH. El porcentaje de células que expresaban la proteína K14 fue similar con los tres medios de cultivo, mientras que el número de células positivas para K15 y ABCG2 disminuyó significativamente en el CPL2. Por otro lado, el marcador p63 solo fue detectado en el CPL0. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K14, K15 y ABCG2. La proteína nuclear p63 se visualiza en amarillo. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

Expresión de marcadores específicos de células epiteliales corneales diferenciadas

La expresión de los marcadores K3 y K12 fue analizada en cada uno de los CPLs consecutivos obtenidos con el medio IOBA-SH. Los niveles de expresión de ARNm en cada uno de ellos fue comparada con la expresión en el CPL0 (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del marcador K3 aumentó ligeramente desde el CPL0 hasta el CPL1 (1,7 veces) y disminuyó significativamente en el CPL2 (0,07 veces, $p \leq 0,001$, Figura 58A). Con un patrón de cambio similar, el porcentaje de células positivas para el marcador K3 fue de $68,5\% \pm 8,7\%$ en el CPL0. Este porcentaje aumentó en CPL1 ($83,4\% \pm 2,1\%$) y disminuyó significativamente en CPL2 ($47,9\% \pm 9,3\%$) ($p \leq 0,05$, Figura 58B y 59).

Por otro lado, la expresión relativa de ARNm fue similar en el CPL0 y el CPL1 (0,9 veces), mientras que disminuyó significativamente en CPL2 (0,002 veces, $p \leq 0,001$) (Figura 58A). Sin embargo, el porcentaje de células que expresaban la proteína K12 fue similar en los tres cultivos primarios consecutivos, con una media del $29,4\% \pm 1,9\%$ (Figuras 58B y 59).

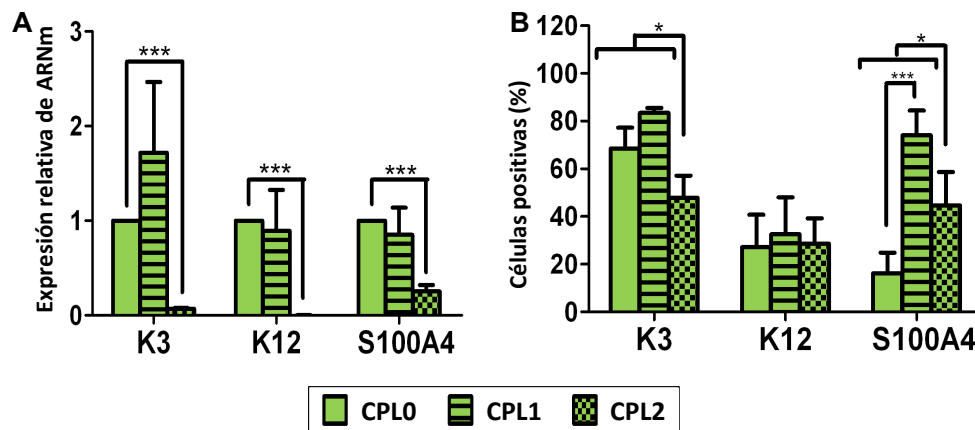


Figura 58. Expresión de marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas y del marcador de fibroblastos S100A4 en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos obtenidos con el medio IOBA-SH. (A) Los resultados de RT-PCR a tiempo real mostraron que la expresión relativa de ARNm de los marcadores de epitelio corneal K3 y K12, así como la expresión relativa del marcador S100A4, disminuyó de forma significativa en el CPL2. (B) El porcentaje de células que expresó la proteína (inmunofluorescencia) K3 disminuyó significativamente en el CPL2, mientras que el porcentaje de células positivas para K12 permaneció constante en los CPLs consecutivos. El porcentaje de células que expresaron S100A4 aumentó significativamente en el CPL1 para volver a disminuir en el CPL2. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Expresión del marcador de fibroblastos S100A4

La expresión de este marcador fue analizada tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm. Todos los CPLs consecutivos expresaron el ARNm del marcador S100A4, así como la proteína correspondiente. La expresión relativa de ARNm de este marcador disminuyó significativamente desde el CPL0 hasta el CPL2 (0,25 veces) ($p \leq 0,001$) (Figura 58A). Sin embargo, el menor porcentaje de células positivas para el marcador S100A4 fue encontrado en el CPL0 (16,2% \pm 8,6%). Este porcentaje aumentó significativamente desde el CPL0 hasta el CPL1 (74,0% \pm 12,0%) y disminuyó de nuevo significativamente en el CPL2 44,6% \pm 16,5%, aunque el porcentaje de células positivas en el CPL2 continuó siendo mayor que en el CPL0 ($p \leq 0,001$ o $p \leq 0,05$) (Figura 58B y 59).

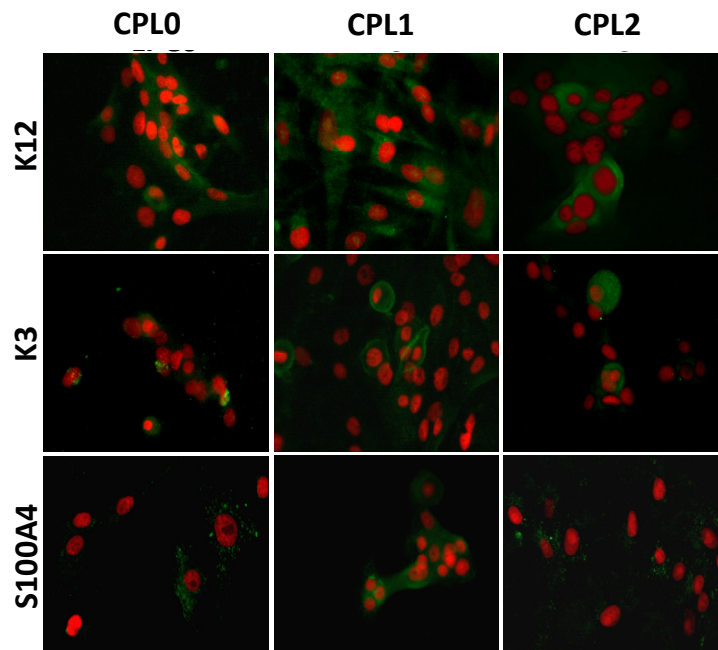


Figura 59. Expresión de marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas y del marcador de fibroblastos S100A4 en los cultivos primarios de limbo (CPLs) consecutivos obtenidos con el medio IOBA-SH. El porcentaje de células que expresaban la proteína (inmunofluorescencia) K12 no cambió entre los diferentes CPLs, mientras que el porcentaje de células que expresó K3 disminuyó significativamente en el CPL2. El porcentaje de células positivas para S100A4 fue menor en el CPL0 que en los otros CPLs. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K3 y K12. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

► En resumen, utilizando el medio de cultivo IOBA-SH, los explantes limbares pueden ser expandidos hasta dos veces consecutivas obteniendo los CPL0, CPL1 y CPL2. Los CPL0 y CPL1 presentaron una población celular con morfología poligonal y que mantenía la

expresión de proteínas propias de CMEL (K14, K15 y ABCG2) y de células corneales epiteliales diferenciadas (K3 y K12). Sin embargo, en el CPL3 la morfología celular comenzó a ser más alargada, mientras que la expresión de la mayoría de los marcadores mencionados anteriormente disminuyó.

2.5. Comparación de los CPLs consecutivos obtenidos con el medio IOBA-toxina colérica e IOBA-SH.

Las principales características de los CPLs consecutivos obtenidos con los medios de cultivo IOBA-toxina colérica e IOBA-SH se comparan en la tabla 12.

		IOBA-toxina colérica				IOBA-SH		
		CPL0	CPL1	CPL2	CPL3	CPL0	CPL1	CPL2
Porcentaje de CPLs confluentes (%)		32,5	50,6	35,9	54,3	29,0	85,9 (*)	60,6
Tiempo para confluencia (días)		26,0	29,7	24,2	33,4	28,9	17,1 (*)	16,9 (*)
Morfología celular		Poligonal-epitelial			Alargada	Poligonal-epitelial		Alargada
Expresión relativa de ARNm	K14	1	2,2	4,0	8x10 ⁻⁵ (*)	1	1,3	3x10 ⁻² (*)
	K15	1	0,6	1,1	8x10 ⁻³ (*)	1	1,1	3x10 ⁻² (*)
	ABCG2	1	2,5	2,6	5,1	1	0,7	1,6
	p63α	1	1,6	2,4	3x10 ⁻³ (*)	1	0,4 (*)	6x10 ⁻³ (*)
	K3	1	0,3	0,8	3x10 ⁻² (*)	1	1,7	7x10 ⁻² (*)
	K12	1	4,8	5,2	7x10 ⁻⁴ (*)	1	0,9	2x10 ⁻³ (*)
	S100A4	1	0,42 (*)	1,1	0,4 (*)	1	0,8	0,2 (*)
Células positivas a nivel proteico (%)	K14	59,3	73,8	46,6	43,6	39,7	33,3	40,5
	K15	0,2	0	0	0	13,5	29,4	0,2 (*)
	ABCG2	43,0	80,8 (*)	75,3	0 (*)	22,5	94,7 (*)	58,3 (*)
	p63	34,2	30,5	0 (*)	0 (*)	10,9	0	0
	K3	63,7	51,1	98,1	86,6	68,5	83,4	47,9 (*)
	K12	28,3	55,4	40,0	6,0 (*)	27,1	32,5	28,6
	S100A4	3,3	41,6 (*)	59,6 (*)	63,4 (*)	16,2	74,0 (*)	44,6 (*)

CPL: cultivo primario de limbo.

(*) Diferencias significativas con el CPL0.

(*) Diferencias significativas con el CPL1.

(*) Diferencias significativas con el CPL2.

(*) Diferencias significativas con todos los CPLs anteriores.

2.6. Mejora de la composición del medio de cultivo IOBA-SH

Para finalizar este objetivo, la composición del medio IOBA-SH fue mejorada definitivamente. Por un lado, se incluyeron variaciones en las concentraciones de ciertos componentes (insulina, hidrocortisona y EGF) para optimizar su mecanismo de acción dentro de las. Por otro lado, se eliminaron de la composición del medio de cultivo la transferrina y el selenio, ya que *a priori* parecía coherente prescindir de ellos por su presencia en el suero sanguíneo. Además, todos los compuestos utilizados en este caso procedían de origen humano, recombinante o habían sido sintetizados mediante procesos químicos. El medio de cultivo se denominó IOBA-SH bioseguro y su composición aparece detallada en la tabla 2.

El medio de cultivo IOBA-SH fue comparado con el medio IOBA-SH bioseguro. Para ello se analizó el rendimiento de los CPLs incubados con cada uno de ellos y la caracterización celular de mismos. Para comprobar que las diferencias encontradas entre los CPLs obtenidos con ambos medios de cultivo no fueron debidas a diferencias en la edad y/o tiempo transcurrido desde la enucleación del tejido hasta su uso en el laboratorio, se compararon los tejidos utilizados en ambos casos. La edad de donantes cuyos tejidos (explantes limbares) fueron incubados con el medio IOBA-SH o IOBA-SH bioseguro fue de $81,2 \pm 3,2$ y $70,5 \pm 5,4$ años respectivamente, no habiendo diferencias significativas (Figura 60A). Sin embargo, el tiempo transcurrido desde la enucleación hasta el uso en el laboratorio de los tejidos fue de $3,2 \pm 0,3$ días en el caso del medio IOBA-SH y de $5,2 \pm 0,6$ días en el caso del medio IOBA-SH bioseguro, habiendo diferencias significativas (Figura 60B). Este dato, es importante tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos en este apartado.

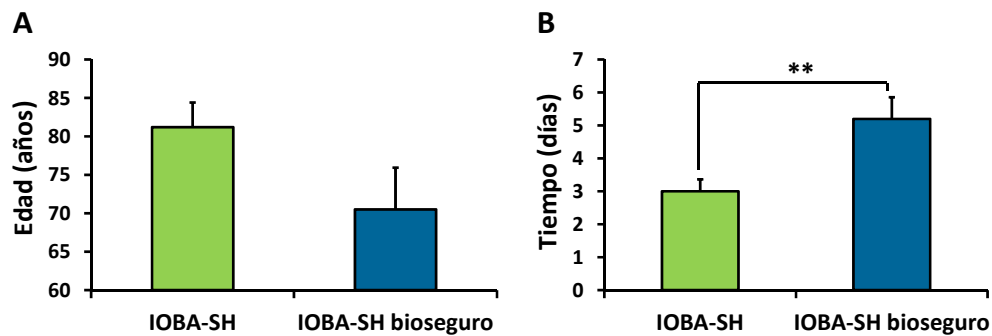


Figura 60. Características de los tejidos limbares utilizados para cultivar células epiteliales limbares con los medios de cultivo IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro. (A) Edad de los donantes de los que proceden los anillos limbares. En este caso, no hay diferencias significativas. (B) Tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra corneo-escleral (enucleación) hasta que los tejidos fueron utilizados en el laboratorio. El tiempo de conservación del tejido fue significativamente mayor en los tejidos que se incubaron con el medio IOBA-SH bioseguro.

2.6.1. Características de los CPLs obtenidos con los medios de cultivo IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro

El medio de cultivo IOBA-SH bioseguro permitió establecer CPLs confluentes, de igual forma que cuando se utilizó el medio IOBA-SH. El porcentaje de CPLs confluentes obtenidos con el medio IOBA-SH ($29,0\% \pm 8,8\%$) fue menor que cuando se utilizó el medio IOBA-SH bioseguro ($40,0\% \pm 6,0\%$) (Figura 61A). Por el contrario, el tiempo necesario para alcanzar dicho estado fue mayor con el IOBA-SH ($26,2 \pm 3,9$ días) que con el IOBA-SH bioseguro ($19,5 \pm 0,7$ días). Sin embargo, ninguna de estas diferencias fueron significativas (Figura 61B). El número total de explantes procedentes de diferentes donantes que fueron cultivados con cada medio se muestra en la tabla 13.

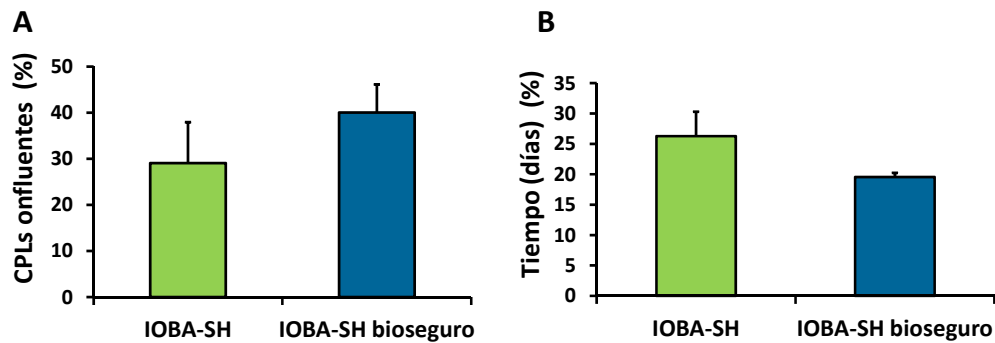


Figura 61. Rendimiento de los cultivos primarios de limbao (CPLs) obtenidos con los medios de cultivo IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro. (A) El porcentaje de cultivos confluentes obtenido fue mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH bioseguro, (B) mientras que el tiempo necesario para alcanzar dicho estado fue menor con dicho medio. En ambos casos las diferencias no fueron significativas.

Tabla 13. Número de explantes limbares sembrados con cada medio de cultivo. En la tabla se muestran el número de explantes limbares sembrados con cada medio de cultivo, así como el número de donantes de los que procedían dichos explantes.

	IOBA-SH	IOBA-SH bioseguro
Nº de donantes	10	17
Explantos limbares sembrados	107	208

2.6.2. Morfología y tamaño celular.

Los CPLs obtenidos con ambos medios presentaron una población con morfología homogénea y poligonal. El tamaño celular fue de 28x50 μm en los CPLs incubados con el medio IOBA-SH y de 28x44 μm cuando se utilizó el medio IOBA-SH bioseguro (Figura 62).

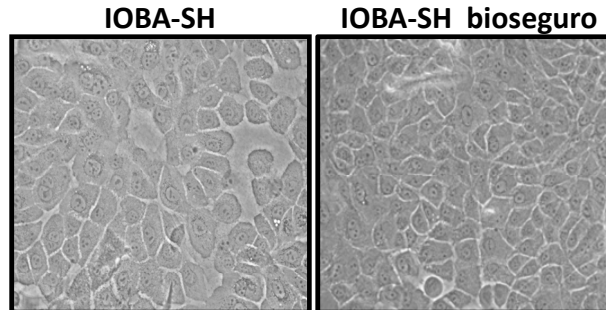


Figura 62. Morfología celular en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos con los diferentes medios de cultivo. Imágenes representativas de los CPLs confluentes, obtenidas en un microscopio óptico invertido de contraste de fases, aumentos. Las células presentaron morfología poligonal con los dos medios de cultivo. Además, el tamaño celular fue similar en ambos casos.

2.6.3. Caracterización de los CPLs

2.6.3.1. Comparación de los CPLs incubados con los medios IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro

Se analizó la expresión de los marcadores propios de CMEL, de células epiteliales corneales y de células de estirpe no epitelial, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, en los CPLs obtenidos con ambos medios de cultivo, con la finalidad de comparar ambos. En este caso, la expresión de ARNm en los cultivos incubados con el medio IOBA-SH fue comparada con la expresión en los cultivos expandidos con IOBA-SH bioseguro, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL (*K14* $13,26 \pm 1,06$ $p \leq 0,001$; *K15* $10,3 \pm 1,6$ $p \leq 0,01$; *ABCG2* $4,85 \pm 1,34$ $p \leq 0,05$ y *p63 α* $2,86 \pm 0,59$ $p \leq 0,05$) fue significativamente mayor en las células de los CPLs incubados con el medio IOBA-SH bioseguro que en los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH (Figura 63). De la misma forma, la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de células epiteliales corneales (*K3* $6,43 \pm 1,8$ $p \leq 0,05$ y *K12* $20,88 \pm 4,21$ $p \leq 0,01$) también fue significativamente mayor en los CPLs incubados con el medio IOBA-SH bioseguro (Figura 63). Por el contrario, la expresión relativa de ARNm del marcador *S100A* fue similar en ambos casos ($1,74 \pm 0,38$ veces con el medio IOBA-SH bioseguro) (Figura 63).

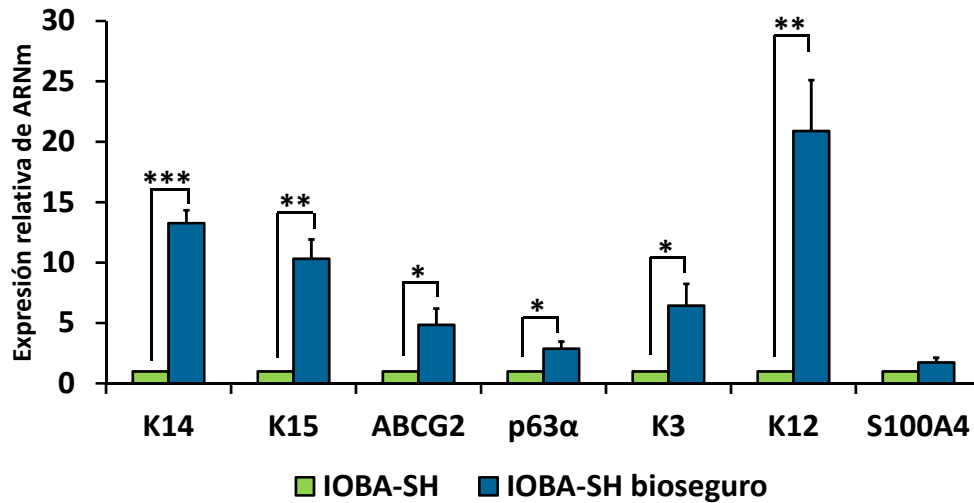


Figura 63. Expresión a nivel de ARNm de los marcadores propios de CMEL, células epiteliales corneales diferenciadas y de fibroblastos en los cultivos primarios de limbo incubados con los medios IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro. La expresión de todos los marcadores fue significativamente mayor en los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH bioseguro, excepto la expresión del marcador de fibroblastos *S100A4* que fue similar en ambos casos.

La expresión de estos marcadores fue también analizada a nivel proteico. Se observó que el porcentaje de células positivas para los marcadores propios de CMEL K14, K15 y ABCG2 fue mayor en los CPLs incubados con el medio IOBA-SH bioseguro ($62,26\% \pm 13,26\%$, $18,70\% \pm 10,40\%$ y $57,33\% \pm 20,54\%$, respectivamente) que en los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH ($39,75\% \pm 22,6\%$; $13,46\% \pm 11,38\%$ y $22,53\% \pm 13,86\%$, respectivamente). Sin embargo, no se detectó la expresión de la proteína p63 (isoforma α) en los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH bioseguro, mientras que las células incubadas con el medio IOBA-SH si que expresaron la proteína p63 ($10,97\% \pm 10,97\%$) (Figura 64). Por otro lado, el porcentaje de células positivas para el marcador de células epiteliales corneales K3 fue similar con ambos medios de cultivo ($68,50\% \pm 8,74\%$ IOBA-SH y $62,85\% \pm 11,13\%$ IOBA-SH bioseguro), mientras que el porcentaje de células positivas para el marcador K12 fue mayor cuando se utilizó el medio el medio IOBA-SH bioseguro ($65,63 \pm 11,68\%$) que cuando los CPLs se incubaron con el medio OBA-SH ($27,10\% \pm 13,60$) (Figura 64). Finalmente, el porcentaje de células positivas para el marcador de fibroblastos S100A4 fue también mayor en los CPLs incubados con el medio IOBA-SH bioseguro ($54,83\% \pm 18,94\%$) que con el medio IOBA-SH ($16,25\% \pm 8,57\%$) (Figura 64). Sin embargo, en ningún caso, estas diferencias fueron significativas.

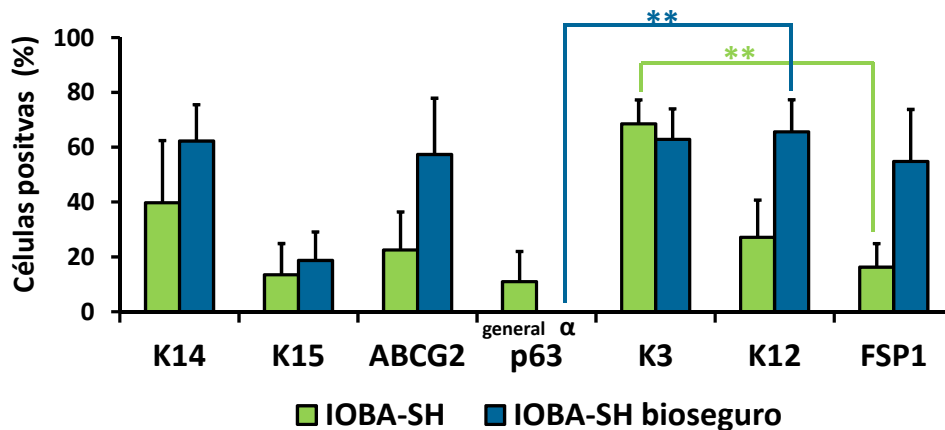


Figura 64. Expresión a nivel proteico de los marcadores propios de CMEL, células epiteliales corneales diferenciadas y de fibroblastos en los cultivos primarios de limbo (CPLs) incubados con los medios IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro. El porcentaje de células positivas para los marcadores propios de CMEL K14, K15 y ABCG2 fue mayor cuando los CPLs fueron incubados con el medio IOBA-SH bioseguro, mientras que la expresión del marcador p63 no fue detectada en los CPLs incubados con el dicho medio. El porcentaje de células positivas para el marcador K3 fue mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH, mientras que el porcentaje de células positivas para los marcadores K12 y S100A4 fue mayor cuando se usó el medio IOBA-SH bioseguro. Ninguna de estas diferencias fueron significativas. Por otro lado, se analizaron las diferencias en el porcentaje de células positivas para cada marcador en los CPLs cultivados con el mismo medio de cultivo.

Se analizó también, a nivel proteico, la expresión de los marcadores propios de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1), células dendríticas (DC11c) y fibroblastos (S100A4). La presencia de estas proteínas no fue detectada en ninguno de los casos (Figura 65).

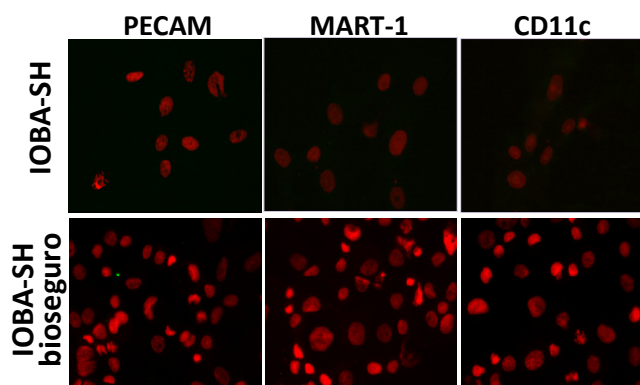


Figura 65. Expresión de marcadores específicos de estirpe no epitelial en los CPLs incubados con los medios IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro. Los marcadores específicos de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c) no fueron detectados a nivel proteico en los diferentes CPLs. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con ioduro de propidio y en verde la localización de las proteínas PECAM, MART-1 y CD11c. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

2.6.3.2. Comparación de la expresión de los marcadores de CMEL, de células epiteliales corneales y de fibroblastos en los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH bioseguro

Por otro lado, se analizó cada uno de los marcadores con respecto a los demás en los CPLs obtenidos con el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro. La expresión de ARNm de los marcadores *K14*, *K15*, *ABCG2*, *p63α*, *K3* y *S100A4* fue comparada con la expresión del marcador *K12* (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm de los marcadores *K14* ($9,38 \pm 0,75$ veces) y *K15* ($1,90 \pm 0,29$) fue significativamente mayor que la expresión de los marcadores *ABCG2* ($0,024 \pm 0,006$ veces) y *p63α* ($0,24 \pm 0,05$ veces), mientras que la expresión relativa de ARNm del marcador *ABCG2* fue significativamente menor que la del *p63α* (Figura 66A). Por otro lado, la expresión relativa de ARNm para el marcador *K3* ($4 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$ veces) fue significativamente menor que para el marcador *K12* (Figura 66B), mientras que la expresión relativa del ARNm para el marcador *S100A4* ($5,89 \pm 1,30$ veces) fue significativamente mayor que para los marcadores *ABCG2*, *p63α*, *K3* y *K12* (Figura 66C).

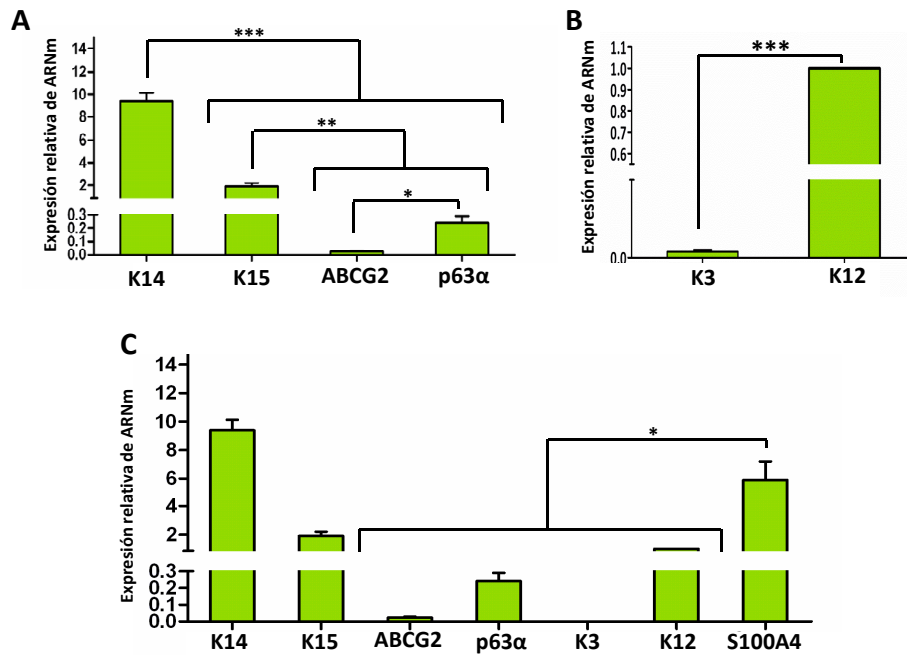


Figura 66. Expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL, células epiteliales corneales diferenciadas y de fibroblastos en los cultivos primarios de limbo incubados con el IOBA-SH bioseguro. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores *K14* y *K15* fue significativamente mayor que la expresión de los marcadores *ABCG2* y *p63α* mientras que la expresión relativa de ARNm del marcador *ABCG2* fue significativamente menor que la del *p63α*. (B) La expresión relativa de ARNm para el marcador *K3* fue significativamente menor que para el marcador *K12*, (C) mientras que la expresión relativa del ARNm para el marcador *S100A4* fue significativamente mayor que para los marcadores *ABCG2*, *p63α*, *K3* y *K12*.

Comparando la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL con la de los marcadores propios de células epiteliales corneales diferenciadas se observó que la expresión relativa de los marcadores de CMEL *K14* y *K15* fue mayor que la de los marcadores corneales *K3* y *K12*. Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del marcador *p63α* fue significativamente mayor que la del marcador *K3* y significativamente menor que la del *K12*. Finalmente, la expresión relativa de ARNm del marcador *ABCG2* fue significativamente menor que la del marcador *K12* (Figura 67).

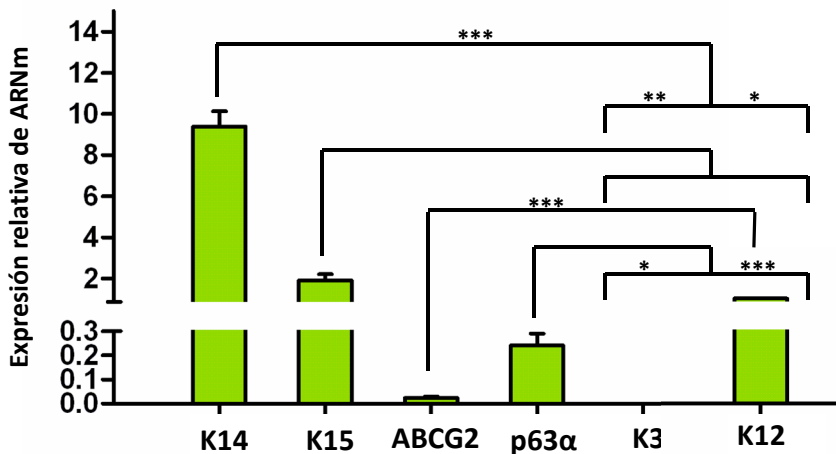


Figura 67. Expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL, células epiteliales corneales diferenciadas y de fibroblastos en los cultivos primarios de limbo incubados con el IOBA-SH bioseguro. La expresión relativa de los marcadores de CMEL *K14* y *K15* fue mayor que la de los marcadores corneales *K3* y *K12*. Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del marcador *p63α* fue significativamente mayor que la del marcador *K3* y significativamente menor que la del *K12*. La expresión relativa de ARNm del marcador *ABCG2* fue significativamente menor que la del marcador *K12*.

La expresión de estos marcadores fue también analizada a nivel proteico. El porcentaje de células positivas para los marcadores propios de CMEL, *K14* y *ABCG2*, fue similar que el porcentaje de células positivas para los marcadores específicos de células epiteliales corneales diferenciadas (*K3* y *K12*) y para el marcador de fibroblastos (*S100A4*). El porcentaje de células positivas para los marcadores *K15* y *p63α* fue menor que el porcentaje de células que expresaron los marcadores mencionados anteriormente, aunque estas diferencias solo fueron significativas entre el marcador *p63α* y el *K12* (Figura 64)

► En resumen, el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro permite obtener más CPLs confluentes y en menos tiempo que el medio de cultivo IOBA-SH, manteniendo una morfología celular poligonal, similar en ambos casos. Además, la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL y de células epiteliales corneales fueron significativamente mayores en los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH bioseguro. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis proteico, aunque esta vez sin diferencias significativas, a excepción del marcador p63. A la vista de estos resultados, y de las desventajas a nivel de composición teórica que presenta el medio de cultivo IOBA-SH frente el medio IOBA-SH bioseguro, este último fue seleccionado para la realización del objetivo 3.

OBJETIVO 3. Determinar qué método de aislamiento de células epiteliales del nicho limbar permite generar cultivos celulares *in vitro* con mayor cantidad de CMEL

Los experimentos de este objetivo se realizaron con el medio de cultivo denominado como IOBA-SH bioseguro (Tabla 2), independientemente de la técnica de aislamiento celular utilizada.

La elección de la técnica (explantes o suspensiones celulares) utilizada para aislar las células epiteliales de cada anillo limbar fue determinada mediante una tabla aleatoria, con el fin de que la variabilidad biológica existente entre diferentes anillos limbares procedentes de distintos donantes afectase lo mínimo posible a los resultados obtenidos. La mejor forma de evitar el efecto de esta variabilidad hubiese sido aislar las células epiteliales mediante ambas técnicas de un mismo anillo limbar, utilizando medio anillo para cada una de ellas. Sin embargo, la cantidad de cultivos primarios confluentes que se pueden obtener a partir de medio anillo limbar, especialmente cuando las células son aisladas mediante la realización de suspensiones celulares, es bastante limitado. Esto conlleva una baja disponibilidad de muestras para la realización las técnicas de caracterización celular, que afecta especialmente a la caracterización celular mediante inmunofluorescencia, para la cual se necesita una cantidad importante células disponibles. Además, en este trabajo se ha analizado la expresión de un número bastante elevado de marcadores, lo cual hace más necesario una alta disponibilidad de muestras. El número de CPLs iniciados a partir de cada una de las técnicas, así como otras características de dichos cultivos se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares.

Características	Explantos	Susp. celulares
Nº de donantes	17	18
Nº de CPLs iniciados	208	61
CPLs confluentes	91	51
Porcentaje de CPLs confluentes	40,03%	94,73%

Para comprobar que las diferencias encontradas entre los CPLs obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares no fueron debidas a diferencias en la edad y/o tiempo transcurrido desde la enucleación del tejido hasta su uso en el laboratorio, se compararon los tejidos utilizados para el aislamiento de células epiteliales limbares mediante explantes y los tejidos utilizados para la realización de suspensiones celulares. La edad de donantes cuyos tejidos se utilizaron para la realización de explantes y suspensiones celulares fue de $70,5 \pm 5,4$ años y $73,8 \pm 5,2$ años, respectivamente, mientras que el tiempo transcurrido desde la enucleación hasta el uso en el laboratorio de los tejidos fue de $5,2 \pm 0,65$ días en el caso de los explantes y de $5,06 \pm 0,6$ días en el caso de suspensiones celulares, no observándose diferencias significativas entre los tejidos donantes utilizados para cada una de las técnicas (Figura 68). Estos resultados, junto con el uso de la tabla de aleatorización, demuestra que las diferencias observadas entre los cultivos obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones no fueron debidas a la variabilidad biológica de las muestras generada por la edad de los donantes y/o el tiempo de conservación de los tejidos desde la enucleación hasta su uso.

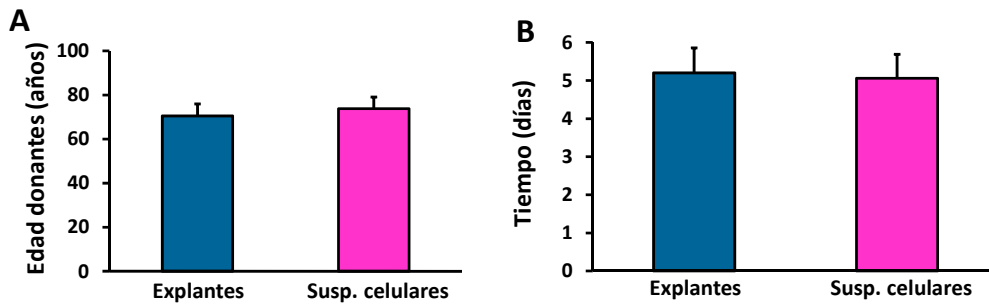


Figura 68. Características de los tejidos limbares utilizados para aislar las células epiteliales mediante explantes o mediante suspensiones celulares. (A) Edad de los donantes de los que proceden los anillos limbares. (B) Tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra corneo-escleral (enucleación) hasta que los tejidos fueron utilizados en el laboratorio. No hubo diferencias significativas en ninguno de estos dos parámetros.

3.1. Características de los cultivos primarios de epitelio limbar obtenidos a partir de diferentes técnicas de aislamiento celular

3.1.1. Análisis del rendimiento celular en los CPLs

Con ambas técnicas de aislamiento celular se consiguieron CPLs de limbo confluentes. El porcentaje de cultivos que alcanzaron dicho estado fue significativamente mayor cuando los cultivos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares ($94,73\% \pm 5,26\%$) que cuando se consiguieron a partir de explantes ($40,03\% \pm 6,08\%$). Como se ha explicado en la sección de materiales y métodos, este dato ha sido calculado considerando el total de los cultivos sembrados en cada condición como el 100%. Sin embargo, para hacer una interpretación adecuada de estos resultados hay que tener en cuenta también el número de CPLs que se pueden iniciar a partir de la misma cantidad de tejido limbar con cada una de las técnicas de aislamiento celular (Figura 69). Teniendo en cuenta estos datos, se puede estimar que el número de CPLs confluentes que se pueden obtener a partir de medio anillo limbar mediante explantes oscila entre tres y cuatro. Sin embargo, se puede estimar que el número de CPLs confluentes que se pueden obtener cuando los cultivos son establecidos a partir suspensiones celulares es dos.

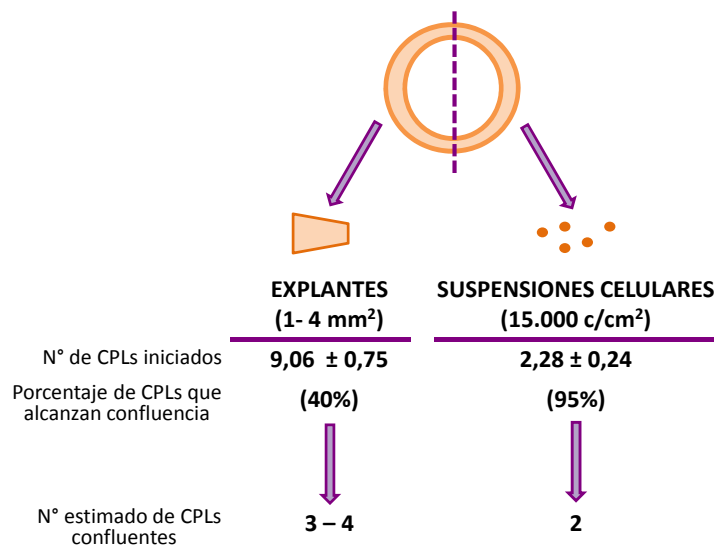


Figura 69. Estimación del número de cultivos primarios de limbo (CPLs) confluentes obtenidos a partir de medio anillo limbar mediante explantes y suspensiones celulares. A partir de medio limbar se obtuvieron una media de nueve explantes que permitieron iniciar nueve CPLs, de los cuales el 40% alcanzaron confluencia. Partiendo de la misma cantidad de tejido limbar, se iniciaron una media de 2 CPLs a partir de suspensiones celulares, de los cuales el 95% alcanzaron confluencia. Por lo tanto, se estima que el número de CPLs confluentes obtenidos mediante explantes oscila entre tres y cuatro, mientras que a partir de suspensiones celulares es dos.

Por otro lado, se analizó el tiempo medio transcurrido desde que los explantes y las suspensiones celulares fueron sembrados hasta que los CPLs alcanzaron el estado de confluencia. Este tiempo varió de forma significativa dependiendo de la técnica utilizada, siendo de $19,61 \pm 0,79$ días a partir de explantes y $13,10 \pm 0,69$ a partir de suspensiones celulares ($p \leq 0,0001$) (Figura 70A).

Se calculó además el número de células que estaban presentes en los CPLs confluentes obtenidos mediante ambas técnicas. En los cultivos obtenidos a partir de explantes se encontró un número significativamente menor de células (177.525 ± 8.805) que en los obtenidos a partir de suspensiones celulares (283.134 ± 22.059) ($p \leq 0,0001$) (Figura 70B). Sin embargo, la viabilidad celular en ambos casos fue similar, $93,99\% \pm 1,50\%$ con explantes y $94,80 \pm 0,99$ con suspensiones celulares (Figura 70C).

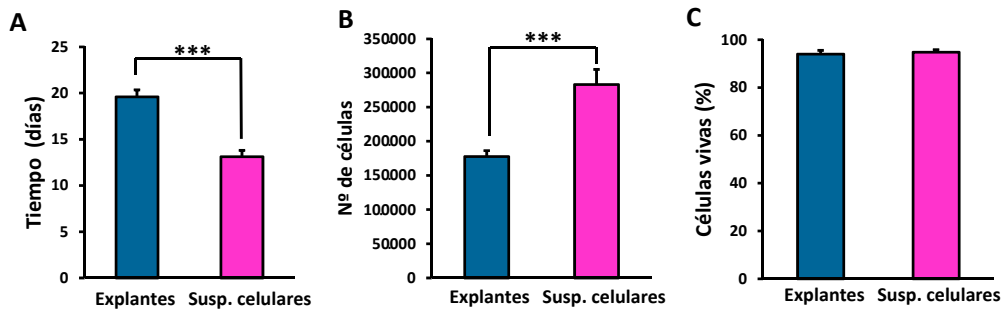


Figura 70. Rendimiento de los cultivos primarios de limbo (CPL) obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares. (A) Tiempo transcurrido desde que los explantes o suspensiones celulares fueron sembrados hasta que los CPL alcanzaron el estado de confluencia. El tiempo necesario para alcanzar dicho estado fue significativamente mayor en los CPLs obtenidos a partir de explantes. (B) El número de células presentes en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares fue significativamente mayor que cuando los CPLs se obtuvieron a partir de explantes. (C) La viabilidad celular en los CPLs confluentes fue similar cuando estos fueron obtenidos a partir de ambas técnicas.*** $p \leq 0,0001$.

3.1.2. Morfología y tamaño celular

Por un lado, se analizó la morfología celular general mediante microscopio óptico. Se observó que los CPLs obtenidos con ambos protocolos de aislamiento celular presentaron células con una morfología poligonal homogénea (Figura 71B). Sin embargo, las células obtenidas mediante explantes fueron significativamente más grandes que las obtenidas mediante suspensiones celulares (Figura 71A).

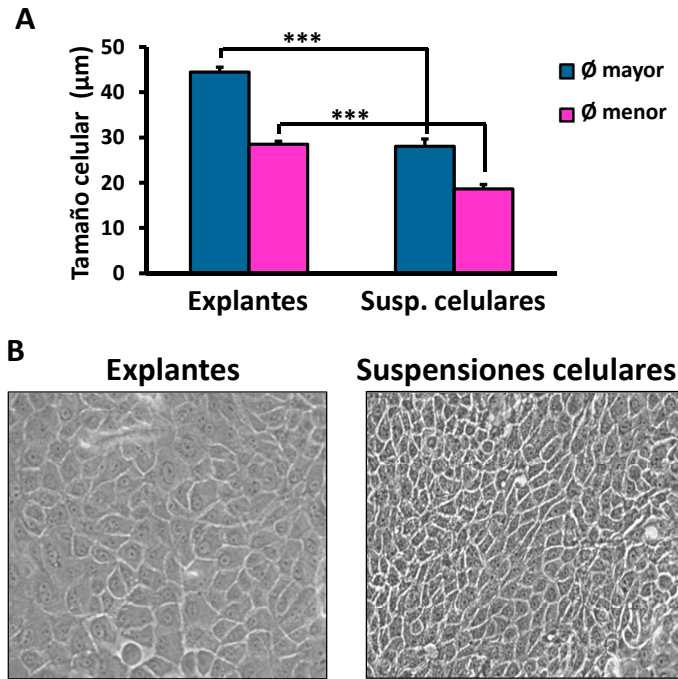


Figura 71. Morfología y tamaño celular en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares. (A) Tamaño celular, calculado midiendo los diámetros celular mayor y menor. (A y B) El tamaño celular fue significativamente mayor en los CPLs obtenidos a partir de explantes. (B) La morfología celular en ambos tipos de cultivo fue poligonal y homogénea. Ø: diámetro.*** $p \leq 0,001$.

Además, se analizó la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica de transmisión ($n=2$). Los resultados obtenidos mostraron que, tanto las células de los CPLs obtenidos a partir de explantes como los obtenidos a partir de suspensiones celulares, presentaron un citoplasma pobre en orgánulos, un núcleo con nucléolos marcados, una elevada cantidad filamentos intermedios y numerosas uniones intercelulares, principalmente desmosomas (Figura 72). Se observaron largas prolongaciones celulares que terminaban en uniones tipo desmosomas principalmente en los cultivos obtenidos a partir de explantes, ya que el espacio intercelular era mayor entre las células que constituían estos cultivos que entre las células de los cultivos obtenidos mediante suspensiones celulares (Figura 72B y E). Por otro lado, se observó también la presencia de liposomas primarios y de microvellosidades en las células obtenidas mediante ambos métodos de aislamiento celular (Figura 72C, D, G y H).

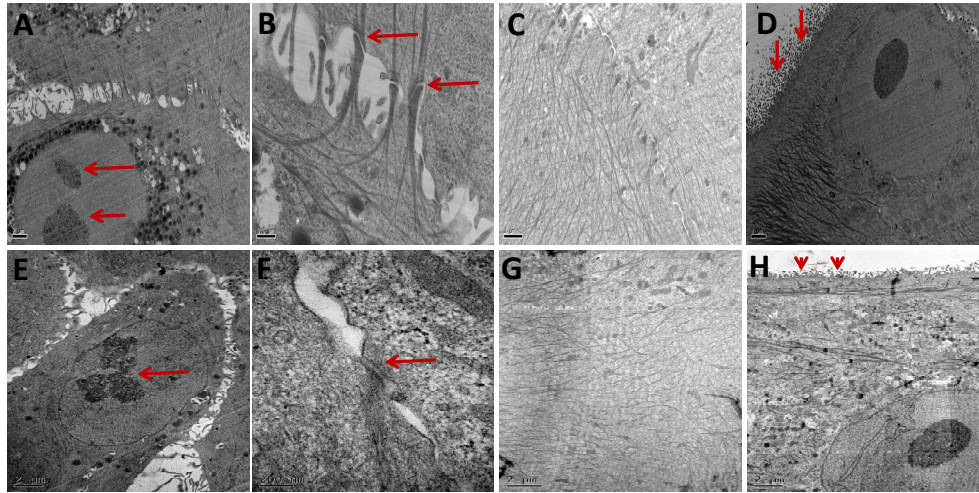


Figura 72. Ultraestructura celular de los cultivos primarios de limbo obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares. No se observaron diferencias entre las células de los cultivos obtenidos a partir de (A, B, C y D) explantes y de (E, F, G y H) suspensiones celulares. En ambos casos se observaron (A y E) nucléolos marcados (flechas rojas) y (A y E) liposomas primarios rodeando el citoplasma así como (B y F, flechas rojas) desmosomas y numerosos (C y G) filamentos intermedios. (D y H, flechas rojas) Se observaron microvellosidades en las zonas superficiales de las células.

3.2. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares

Para realizar la caracterización celular, se analizaron 4 cultivos primarios obtenidos de 4 explantes distintos procedentes de 4 donantes diferentes (n=4) mediante la técnica de inmunofluorescencia y 6 cultivos primarios obtenidos de 6 explantes distintos procedentes de 6 donantes diferentes (n=6) mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real.

3.2.1. Expresión de marcadores típicos de células madre epiteliales limbares

Se analizó la expresión de los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 α , tanto a nivel proteico mediante inmunofluorescencia como a nivel de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real. Los niveles de expresión de ARNm en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares fueron comparados con la expresión en los cultivos obtenidos a partir de explantes (utilizados como calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del marcador K14 fue similar cuando los cultivos fueron obtenidos a partir de explantes y suspensiones celulares (0,86 veces) (Figura 73A), mientras que el porcentaje de células positivas para esta proteína fue significativamente mayor cuando

los cultivos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares ($99,34\% \pm 0,42\%$) que a partir de explantes ($62,26\% \pm 13,26\%$) ($p \leq 0,05$) (Figuras 73B y 74).

De la misma forma, el nivel de ARNm relativo del marcador K15 fue expresado 1,8 veces más en los cultivos realizados mediante suspensiones celulares que en los CPLs obtenidos a partir de explantes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Figura 73A). Además, el porcentaje de células que expresaron el marcador K15 fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares ($51,89\% \pm 5,10\%$) que a partir de explantes ($18,70\% \pm 10,40\%$) (Figuras 73B y 74).

La expresión de relativa de ARNm del gen ABCG2 fue similar en los cultivos obtenidos por ambas técnicas (Figura 66A). Por otro lado, el $57,33\% \pm 20,54\%$ de las células expresaron la proteína ABCG2 en los cultivos obtenidos a partir de explantes, mientras el porcentaje fue mayor en los cultivos obtenidos mediante suspensión celular ($85,47\% \pm 8,53\%$), aunque esta diferencia no fue significativa (Figuras 73B y 74).

Finalmente, se analizó la expresión del marcador p63 α . La expresión de ARNm de este marcador fue significativamente menor en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares (0,79 veces) que en los obtenidos mediante explantes ($p \leq 0,05$) (Figura 73A). Sin embargo, este marcador se expresó a nivel proteico en el $42,76\% \pm 14,50\%$ de las células presentes en los cultivos conseguidos mediante de suspensiones celulares, mientras que las células obtenidas a partir de explantes no lo expresaron (Figura 73B y 74).

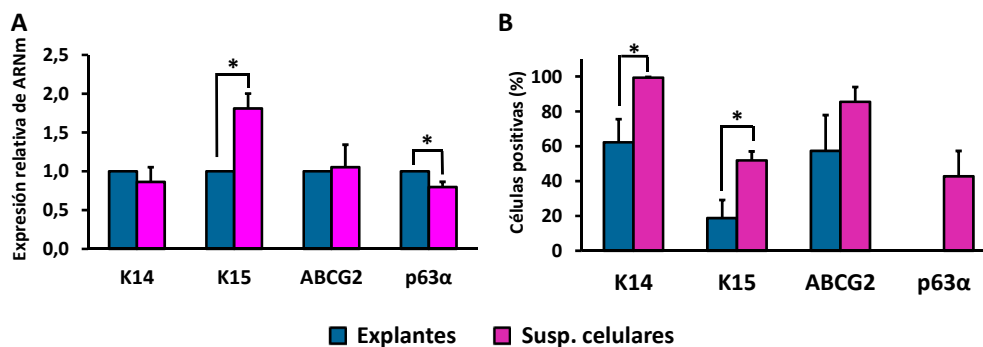


Figura 73. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo obtenidos (CPLs) a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores K14 y ABCG2 fue similar en los CPLs obtenidos mediante ambas técnicas de aislamiento celular, mientras que los marcadores K15 y p63alfa se expresaron más en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares y explantes respectivamente. En ambos casos estas diferencias fueron estadísticamente significativas. (B) El porcentaje de células positivas para los marcadores K14, K15 y ABCG2 fue mayor en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares; sin embargo, estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el caso de los marcadores K14 y K15. (B) Por otro lado, la proteína p63 α solo se expresó en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares. * $p \leq 0,05$.

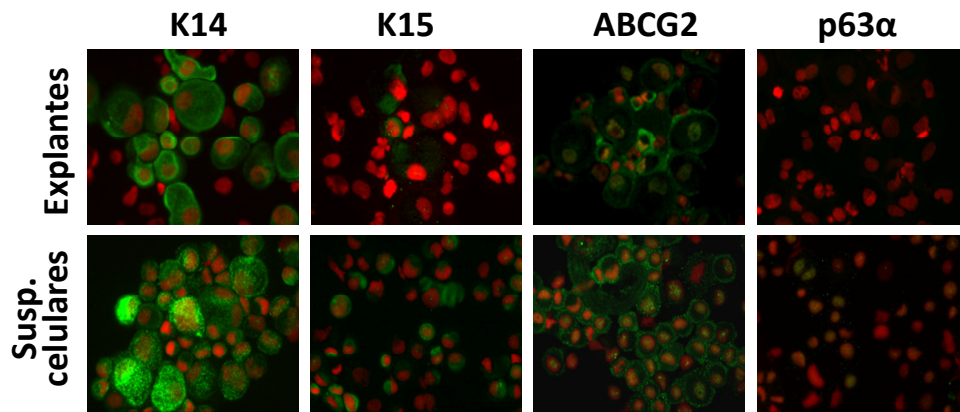


Figura 74. Expresión de marcadores de células madre epiteliales limbares en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. El porcentaje de células que expresaron las proteínas K14, K15 y ABCG2 fue mayor en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares que a partir de explantes, mientras que la proteína p63 α solo se expresó en los CPLs obtenidos a partir de esta técnica de aislamiento. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con iodo de propidio y en verde la localización de las proteínas K14, K15 y ABCG2. La proteína nuclear p63 α se visualiza en amarillo. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

3.2.2. Expresión de marcadores típicos de células epiteliales corneales diferenciadas

La expresión de las proteínas K3 y K12 fue analizada mediante inmunofluorescencia, así como la expresión relativa de los ARNm correspondientes mediante RT-PCR a tiempo real. Los niveles de expresión de ARNm en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares fueron comparados con la expresión en los cultivos obtenidos a partir de explantes (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

La expresión relativa de ARNm del gen de K3 fue 2,37 veces mayor cuando los cultivos se obtuvieron mediante suspensiones celulares, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 75A). El porcentaje de células positivas para este marcador fue similar en los cultivos obtenidos por ambas técnicas, observándose un $62,85 \pm 11,53\%$ de células positivas en los cultivos obtenidos a partir de explantes y un $57,79\% \pm 14,74\%$ a partir de suspensiones celulares (Figuras 75B y 76).

Por otro lado, la expresión relativa de ARNm fue similar en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares (1,25 veces) o en los obtenidos a partir de explantes (Figura 75A). Además, el porcentaje de células que expresaron la proteína K12 también fue similar cuando se utilizó el protocolo de explantes ($65,63\% \pm 11,68\%$) y el de suspensiones celulares ($68,70\% \pm 23,15\%$) (Figuras 75B y 76).

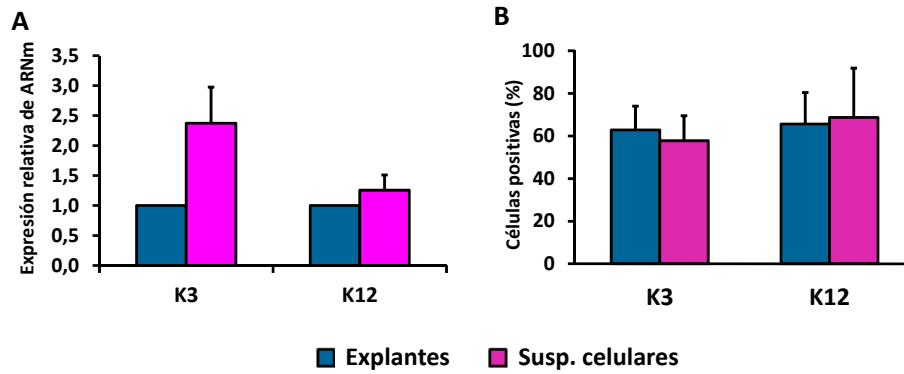


Figura 75. Expresión de marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas en cultivos primarios (CPLs) de limbo obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. (A) La expresión relativa de ARNm de los marcadores K3 y K12 fue mayor en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (B) El porcentaje de células positivas para los marcadores K3 y K12 fue similar en los cultivos obtenidos a partir de ambas técnicas de aislamiento celular.

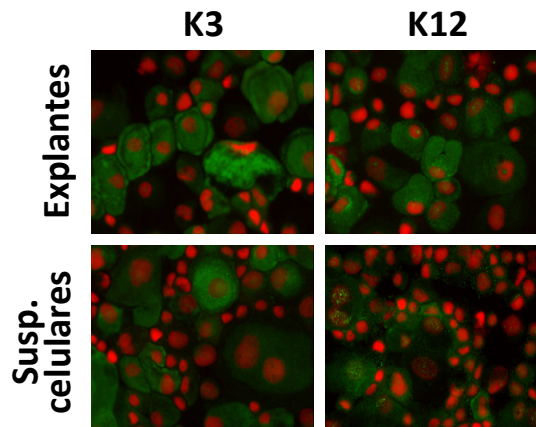


Figura 76. Expresión de los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas en cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. El porcentaje de células positivas para los marcadores K3 y K12 fue similar en los CPLs obtenidos a partir de ambas técnicas de aislamiento celular. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas K3 y K12. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos.

3.2.3. Expresión de marcadores específicos de estirpes celulares no epiteliales

Se analizó la expresión del marcador de fibroblastos S100A4 a nivel de ARNm y de proteína. La expresión relativa de ARNm para el del marcador S100A4 en los CPLs obtenidos mediante suspensiones celulares fue comparada con la expresión en los cultivos obtenidos a partir de explantes, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1.

Además, se analizó a nivel proteico la expresión de marcadores propios de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c).

El marcador S100A4 fue detectado tanto en los CPLs obtenidos a partir de explantes como a partir de suspensiones celulares. La expresión relativa de ARNm para el marcador S100A4 fue significativamente mayor en los CPLs obtenidos a partir de explantes que a partir de suspensiones celulares ($p \leq 0,001$) (Figura 77A). De la misma forma, el porcentaje de células positivas para dicho marcador fue también mayor en los cultivos obtenidos a partir de explantes, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas (Figura 77B). Por el contrario, las proteínas PECAM, MART-1 y CD11c no se expresaron en los cultivos obtenidos mediante explantes ni mediante suspensiones celulares (Figura 77C).

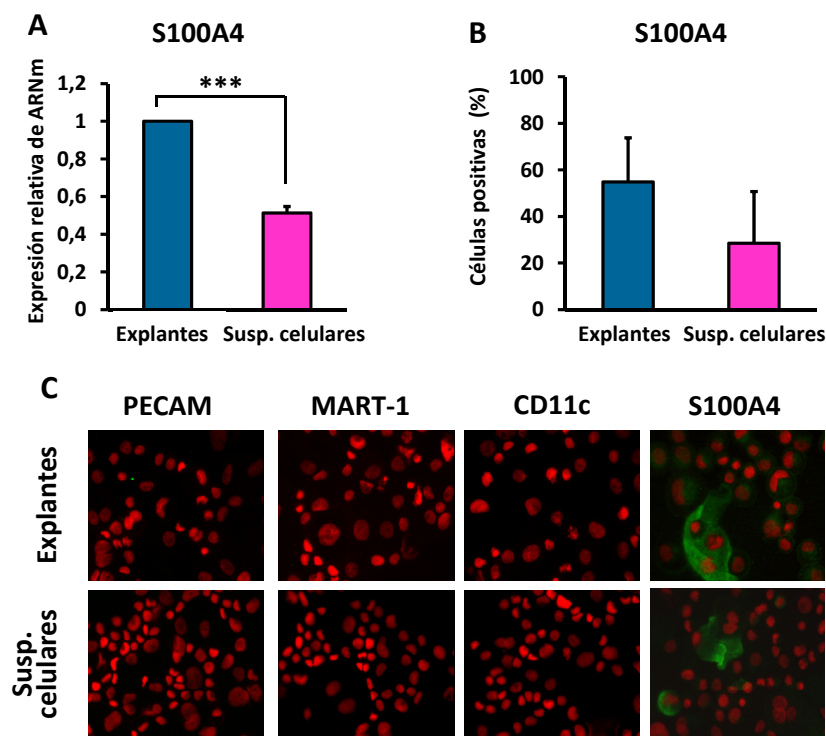


Figura 77. Expresión de marcadores específicos de estirpes celulares no epiteliales. (A) La expresión relativa de ARNm del gen S100A4 fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos mediante explantes. (B y C) La proteína S100A4 fue también detectada tanto en los cultivos obtenidos a partir de explantes como en los obtenidos a partir de suspensiones celulares, sin embargo en este caso no hubo diferencias significativas. (C) Los marcadores específicos de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c) no fueron detectados a nivel proteico en los diferentes cultivos primarios, independientemente de la técnica de aislamiento celular utilizada. Se muestran en rojo los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en verde la localización de las proteínas PECAM, MART-1, CD11c y S100A4. Imágenes representativas tomadas con un microscopio óptico invertido de fluorescencia a 40X aumentos. *** $p \leq 0,001$.

3.3. Análisis funcional de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes y suspensiones celulares

Para realizar los ensayos de clonogenicidad, el número de células de partida necesario es muy pequeño, por lo que con un solo CPL de cada condición es posible realizar este tipo de ensayos. En este caso, se realizaron explantes y suspensiones celulares del mismo anillo limbar, utilizando para cada técnica medio anillo limbar.

3.3.1. Análisis de la expresión del marcador de proliferación celular Ki67.

La proteína Ki67 está presente en las células durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), sin embargo no se expresa en células que están quiescentes (G0), por ello es una proteína asociada a la proliferación celular.¹⁶⁹ El porcentaje de células positivas para el marcador Ki67 fue similar, sin diferencias significativas, en los cultivos obtenidos a partir de explantes (64,6% ± 8,5%) que a partir de suspensiones celulares (56,5% ± 9,1%) (Figura 78A). La expresión de este marcador se analizó en 4 cultivos primarios procedentes de 4 donantes diferentes (n=4) en cada una de las condiciones.

3.3.2. Análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Para determinar cuántas células de las obtenidas en los CPLs confluentes eran capaces de generar colonias clonogénicas, se analizó el número de UFC. Se observó que el porcentaje de UFC fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares (8,31% ± 1,37%) que a partir de explantes (1,00% ± 0,23%) ($p \leq 0,05$) (Figura 78B, C y tabla 15). El número de cultivos primarios en los que se analizó las UFC fue de n=5 procedentes de explantes y de n=8 procedentes de suspensiones celulares.

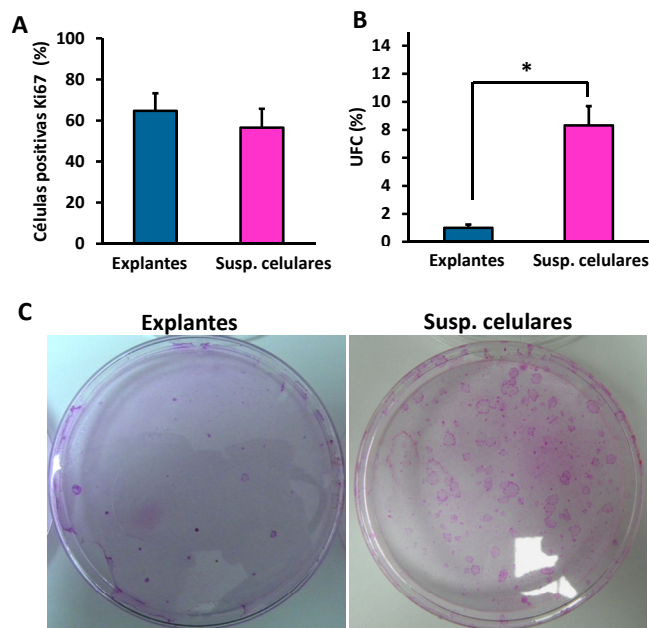


Figura 71. Análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC) y del marcador Ki67 en cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares. (A) El número de células que expresaron el marcador Ki67 fue similar en ambos casos, (B y C) mientras que el número de UFC fue significativamente mayor en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares que cuando los CPLs fueron obtenidos a partir de explantes. Imágenes macroscópicas representativas de las colonias fijadas y teñidas con rodamina B. * $p \leq 0,05$.

Tabla 15. Resumen de los resultados obtenidos de los ensayos de clonogenicidad.

Explantos

Donantes	UFC (%)	Tamaño (μm) de las colonias levantadas	*	Holoclon	Meroclon	Paraclon
1	0,6	822 \pm 136	0/10	0%	0%	100%
2	10,5	942 \pm 100	1/10	0%	0%	100%
3	1,4	586 \pm 62	0/10	0%	0%	100%
4	0,4	688 \pm 68	0/10	0%	0%	100%
Media \pm SEM	3,2 \pm 2,4	760 \pm 78	0,2/10	0%	0%	100%

Suspensiones celulares

Donantes	UFC (%)	Tamaño (μm) de las colonias levantadas	*	Holoclon	Meroclon	Paraclon
1	7,0	753 \pm 54	3/10	0%	20%	80%
2	5,6	852 \pm 104	3/10	0%	10%	90%
3	17,8	904 \pm 58	3/10	0%	10%	90%
4	10,4	859 \pm 74	1/10	0%	0%	100%
Media \pm SEM	10,2 \pm 2,7	842 \pm 32	2,5/10	0%	10% \pm 4%	90% \pm 4%

*Número de colonias que originan nuevas colonias / número de colonias levantadas y sembradas.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

3.3.3. Análisis del tipo de colonias formadas: holoclonos, meroclones y paraclones

Finalmente, se determinó si las colonias que se originaron a partir de las células de los CPLs confluentes obtenidos a partir de explantes y suspensiones celulares eran holoclonos (procedentes de células indiferenciadas), meroclones (procedentes de células transitorias) o paraclones (procedentes de células diferenciadas), pudiendo establecer así la presencia de células madre, células transitorias o células en un estadio avanzado de diferenciación. Se observó que las células presentes en los CPLs obtenidos a partir de explantes solo fueron capaces de generar colonias de tipo paraclon (100% paraclones,) no encontrándose ni meroclones ni holoclonos (Figuras 79, 80A y 80D). Por otro lado, el porcentaje de paraclones encontrado en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares fue del $90\% \pm 4,0\%$ (Figuras 79, 80B y 80). En este caso sí, que se encontraron colonias de tipo meroclon $10\% \pm 4,0\%$, cuya presencia fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares que a partir de explantes ($p \leq 0,05$) (Figuras 79, 80C y 80F). Cabe destacar también, que los paraclones obtenidos a partir de las células obtenidas de los cultivos primarios crecidos a partir de explantes se clasificaron como tal porque sus células no fueron capaces de proliferar para originar otras colonias. Sin embargo, en el caso de las suspensiones celulares, las células de las colonias tipo paraclon sí que fueron capaces de originar nuevas colonias, aunque todas ellas fueron colonias terminales (Figura 80E y F). El número de CPLs en los que se analizó el tipo de colonias formadas fueron $n=4$ tanto para los cultivos procedentes de explantes como para los cultivos procedentes de suspensiones celulares.

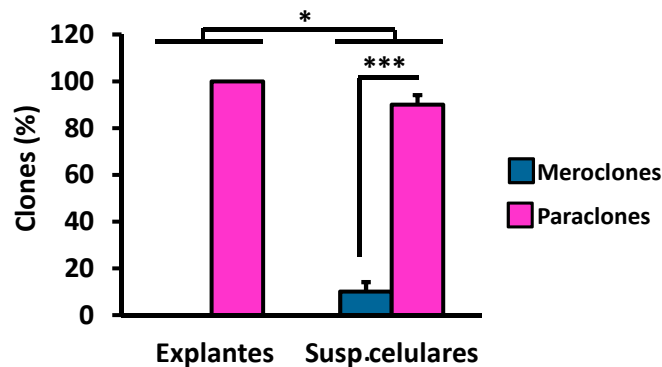


Figura 79. Análisis del tipo de colonias formadas por las células presentes en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. Las células presentes en los CPLs obtenidos a partir de explantes solo fueron capaces de generar colonias de tipo paraclon. Por otro lado, el porcentaje de paraclones encontrados en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares fue del 90%. Solo se encontraron meroclones en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares (10%). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0001$.

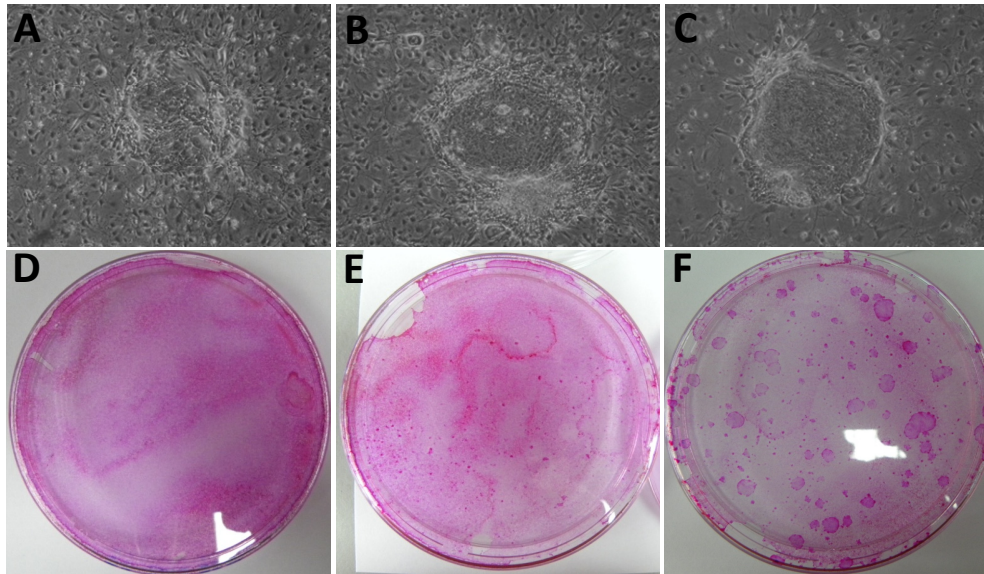


Figura 80. Análisis del tipo de colonias formadas por las células presentes en los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de explantes y a partir de suspensiones celulares. (A) Paraclon obtenido a partir de explantes. (B) Paraclon y (C) meroclon obtenidos a partir de suspensiones celulares. (D) Colonias formadas a partir de los paraclones encontrados en los CPLs establecidos mediante explantes. (E) Paraclones y (F) meroclones encontrados en los CPLs establecidos mediante suspensiones celulares. Los paraclones obtenidos a partir de las células obtenidas de los CPLs crecidos a partir de explantes se clasificaron como tal porque sus células no fueron capaces de proliferar para originar otras colonias. Sin embargo, en el caso de las suspensiones celulares, las células de las colonias tipo paraclon sí que fueron capaces de originar nuevas colonias, aunque todas ellas fueron colonias terminales. (A, B y C) Imágenes representativas de paraclones y meroclones obtenidas mediante microscopía óptica invertida de fases a 4X aumentos. (D, E y F) Imágenes representativas de las colonias obtenidas al cultivar las células que formaban los paraclones y los meroclones, fijadas y teñidas con rodamina B.

► Con los resultados obtenidos en esta objetivo, se puede afirmar que, con nuestras condiciones de cultivo, los CPLs establecidos a partir de suspensiones celulares mostraron mayor número de células con características propias de CMEL o de células amplificadas transitorias que cuando los CPLs fueron obtenidos cultivando explantes (Tabla 16).

Tabla 16. Características de los cultivos primarios de limbo (CPLs) generados a partir de dos técnicas diferentes de aislamiento celular: explantes y suspensiones celulares.

Características	Explantes	Suspensiones celulares	Ventaja
CPLs confluentes	40%	94%	Suspensiones celular
Tiempo para alcanzar confluencia (%)	20	13	Suspensiones celular
N° de células en los CPLs confluentes	175.000	285.000	Suspensiones celular
Viabilidad celular	94%	94%	Similar
Morfología y tamaño celular (µm)	45x28, cuboidal	28x18, cuboidal	Suspensiones celular
Presencia de nucleolus definidos, lisosomas, filamentos intermedios, desmosomas, and microvellosidades	Si	SI	Similar
Expresión de marcadores de CMEL	Menor o similar	Mayor o similar	Suspensiones celular
Expresión de marcadores de epitelio corneal	Menor o similar	Mayor o similar	Explantes
Expresión de marcadores propios de células endoteliales, melanocitos y células dendríticas	No	No	Similar
Expresión de marcadores de fibroblastos	Mayor	Menor	Suspensiones celular
Células proliferando	65%	56%	Similar
UFC	1%	8%	Suspensiones celular
Presencia de:			
• Holoclonos	No	No	Suspensiones celular
• Meroclones	No	10%	
• Paraclones	100%	90%	

UFC: Unidades formadoras de colonias

DISCUSSION

Con el desarrollo de este trabajo, se ha podido demostrar que es posible optimizar los procedimientos utilizados actualmente para el cultivo *in vitro* de CMEL.

En primer lugar, se ha demostrado que es posible cultivar de forma consecutiva el mismo explante limbar, obteniendo hasta tres CPLs (CPL0-CPL2) que mantienen un elevado número de células con fenotipo propio de CMEL, así como una morfología poligonal, típica de células epiteliales. Por el contrario, en los CPL3-CPL4 las células comenzaron a adquirir una morfología más alargada, cambio que coincide con la disminución de la expresión de los marcadores propios de CMEL y con el aumento en la expresión del marcador S100A4, típico de fibroblastos. En estudios similares, Li *et al.* cultivaron de forma consecutiva tres veces el mismo explante limbar. En este estudio, observaron que el número de UFC presentes en cada cultivo primario disminuyó a medida que se iban realizando los pases consecutivos, mientras que el tamaño celular aumentó.¹⁵⁹ Sin embargo, la caracterización de los CPLs no se realizó, ya que la finalidad del estudio no lo requería. Recientemente, Selver *et al.* caracterizaron los CPLs obtenidos de la expansión consecutiva de explantes limbares, aunque solamente se analizó la expresión del marcador ABCG2, siendo la finalidad del estudio la puesta a punto de una técnica para la detección de dicho marcador. Sin embargo, para demostrar que es posible expandir varias veces el mismo explante limbar, de tal forma que los CPLs obtenidos mantengan una población celular indiferenciada y que por tanto puedan ser utilizados en la clínica humana, es indispensable caracterizar dichos cultivos de forma exhaustiva, propósito que se ha llevado a cabo a lo largo de este trabajo y que, previamente, no se había descrito en la bibliografía.

Para demostrar esto, se cultivaron 190 explantes, de los cuales el 32,5% alcanzó confluencia en el CPL0. Este bajo índice de éxito puede ser atribuido al uso de tejidos prodecentes de donantes cadáver, así como a la edad avanzada de los mismos. James *et al.* postularon que a medida que la edad de los donantes avanzaba la capacidad de sus tejidos limbares para originar cultivos primarios iba disminuyendo, hecho que ha sido recientemente corroborado por Notara *et al.*^{170,171} Además, Vemuganti *et al.* demostraron que los tejidos procedentes de donantes vivos tienen mayor potencial para originar cultivos primarios confluentes que los tejidos procedentes de donantes cadáver.¹⁷² Otro factor que puede estar influyendo en el porcentaje de cultivos confluentes obtenidos es la región del anillo limbar de la que se han extraído los explantes. En estos experimentos, los explantes limbares se han tomado de todo el anillo limbar, teniendo explantes procedentes de las regiones inferior y superior, donde se concentran la mayor parte de las células indiferenciadas, y explantes procedentes de las zonas nasal y temporal, donde este tipo celular es escaso.¹⁷³ Esto puede dar lugar a que los CPLs establecidos a partir de explantes de las regiones superiores e inferiores originen CPLs

confluentes con mayor facilidad, mientras que los otros pueden tener más dificultades en conseguirlo, lo cual puede desembocar en un porcentaje total de CPLs confluentes bajo.

Para solventar el problema de la edad avanzada de los donantes utilizados en este objetivo se diseñó un nuevo medio de cultivo (medio IOBA-toxina colérica). La composición del medio de cultivo incluye el uso de componentes que aumentan la proliferación celular (normalmente utilizados en el cultivo de células epiteliales limbares) como el FBS,¹⁴⁵ la insulina, el EGF¹⁷⁴ y la hidrocortisona.¹⁷⁵ Además, incluye suplementos como la transferrina,¹⁷⁶ el selenio¹⁷⁷ y el DMSO,¹⁵¹ que reducen el daño celular causado por los radicales libres. No obstante, el componente de mayor importancia en este medio de cultivo es la toxina colérica. La toxina colérica aumenta la concentración intracelular del AMPc (adenosin monofosfato cíclico) mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa.^{178,179} Actualmente, la acción de esta molécula sobre queratinocitos cultivados *in vitro* está en controversia. Delscluse *et al.* y Yamanishi *et al.* describieron que el AMPc disminuía la proliferación celular,^{180,181} mientras que autores como Green *et al.* y Okada *et al.* encontraron que este compuesto aumentaba la proliferación celular cuando se usaba dentro de un rango de concentraciones determinado,^{149,150,182} por lo que, actualmente, la toxina colérica es utilizada para incrementar la proliferación *in vitro* de las células epiteliales limbares. Por otro lado, Green *et al.* describieron las dificultades que existían para cultivar células epiteliales partiendo de tejidos procedentes de donantes de edad avanzada utilizando medios de cultivo carentes de toxina colérica y que cuando se utilizaban estos medios era muy difícil realizar pases consecutivos de las células obtenidas. Sin embargo, la proliferación celular en ambos casos mejoraba cuando el medio era suplementado con toxina colérica.¹⁴⁹ Años después, Ma *et al.* demostraron que este compuesto era crucial para realizar pases consecutivos de células corneales cultivadas *in vitro*.¹⁸³ En este contexto, y apoyándonos en estudios que utilizaban cantidades de toxina colérica similares para el cultivo de CMEL,¹⁸⁴ se utilizó un medio de cultivo con una elevada concentración de toxina colérica.

Para estudiar los cambios que tenían lugar en la población celular de los cultivos primarios obtenidos de forma consecutiva, se realizó la caracterización celular de los mismos mediante RT-PCR a tiempo real e inmunofluorescencia. Como se ha comentado anteriormente, en la actualidad no existe un marcador específico para detectar las CMEL, por lo que en este trabajo se ha utilizado una batería de marcadores que se expresan de manera mayoritaria en las CMEL que en las células epiteliales corneales diferenciadas (revisado por¹⁸⁵⁻¹⁸⁷). Muchos investigadores han demostrado que las K3 y K12 son expresadas de forma específica en el epitelio corneal, definiendo a ambas como marcadores de células corneales diferenciadas.^{42,43} Por otro lado, la expresión de los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 ha sido detectada de forma mayoritaria en las capas basales del epitelio limbar, por lo que éstos

se han establecido como marcadores de CMEL.^{79,80,82,128,188} Los resultados obtenidos durante el proceso de validación de los marcadores K3, K12, K15, ABCG2 y p63, utilizados a lo largo de esta tesis doctoral, concuerdan con estas premisas establecidas de forma sólida en la bibliografía, por lo que podemos decir que los marcadores utilizados en la caracterización celular son adecuados y proporcionan una información fiable. Sin embargo, hemos podido observar que el marcador K14 se expresa tanto en las células de las capas basales del epitelio limbar como en las células del epitelio corneal. Kurpakus *et al.*, en 1991, también observaron un patrón de expresión del marcador K14 similar al detectado por nosotros,¹⁸⁹ por lo que este marcador podría ser el menos específico de los utilizados en este trabajo para detectar CMEL. Por otro lado, el marcador ABCG2 no se detectó solamente en el epitelio limbar, sino que también fue detectado en el estroma limbar, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por Du *et al.*, quienes demostraron que las células madre del estroma limbar también expresan el marcador ABCG2.⁶³ Finalmente, la expresión del marcador S100A4 fue detectada en el estroma limbar y corneal. Basándonos en estudios previos que establecieron el marcador S100A4 como marcador específico de fibroblastos, podemos relacionar la expresión de este marcador con los fibroblastos estromales.⁶¹

Durante la caracterización de los CPLs, la RT-PCR a tiempo real confirmó la expresión tanto de marcadores típicos de CMEL como de células corneales diferenciadas en los CPL0, CPL1 y CPL2, así como la disminución de la expresión de los mismos en los cultivos a partir del CPL3, con la excepción del marcador ABCG2, cuya expresión relativa de ARNm en los CPL1-CPL2 fue similar que en los CPL5-CPL6.

Por el contrario, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia revelaron que el porcentaje de células positivas para los marcadores K3 y K12 fue alto en la mayoría de los CPLs consecutivos (CPL0-CPL6). Esta aparente discrepancia entre los resultados de RT-PCR a tiempo real y de inmunofluorescencia es debida a que con la RT-PCR a tiempo real se ha medido la cantidad relativa de ARNm, mientras que con la inmunofluorescencia se cuantificó el porcentaje de células positivas. De esta forma, una cantidad pequeña de ARNm podría dar lugar a un elevado porcentaje de células que expresan la proteína que codifica dicho ARNm si este ARNm está repartido entre muchas células. Por el contrario, cantidades elevadas de ARNm podrían dar lugar a un porcentaje pequeño de células expresando la proteína correspondiente si éste está concentrado en pocas células. De esta forma, los resultados de RT-PCR a tiempo real y de inmunofluorescencia, tal y como han sido valorados en este trabajo, no son directamente comparables, al igual que se ha explicado en otros estudios.¹⁹⁰

El porcentaje de células que expresaron las proteínas K14, K15, ABCG2 y p63 disminuyó desde el CPL0 hasta el CPL2, mientras que el porcentaje de células expresando los marcadores típicos de células epiteliales corneales diferenciadas aumentó. Sin embargo, los cambios observados entre el CPL0 y el CPL2 no fueron significativos respecto a la expresión de ningún marcador, ni a nivel de ARNm ni de proteína, excepto para p63. Por otro lado, un pequeño porcentaje de células positivas para el marcador S100A4 fue detectado en los CPL0-CPL2, sugiriendo la presencia de una pequeña población de fibroblastos o de células en transición epitelio-mesénquima en estos cultivos. Chen *et al.* demostraron en 2011 que la interacción entre fibroblastos y células epiteliales limbares podía preservar las propiedades de células las indiferenciadas, lo que hace pensar que las células positivas para S100A4 encontradas en los CPL0-CPL2 podrían estar interactuando con las células madre epiteliales para preservar sus propiedades.¹⁹¹ Sin embargo, el porcentaje de células positivas para S100A4 fue muy elevada en los CPL4-CPL6, revelando una elevada cantidad de fibroblastos o de células en transición epitelio-mesénquima. Esto sugiere que las células que migraron desde el tejido limbar hacia el pocillo mantenían las características fenotípicas propias de CMEL en los cultivos CPL0, CPL1 y CPL2, pero que perdían dichas características en el CPL3. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Li *et al.*, los cuales sugieren que las CMEL migran desde el epitelio limbar hacia el sustrato durante el cultivo *in vitro*, pero que el porcentaje de células progenitoras que salen del tejido hacia el soporte de cultivo disminuye a medida que se realizan los pases consecutivos del explante, debido a que durante este proceso las CMEL comienzan a migrar hacia el interior del estroma en vez de hacia la placa de cultivo.¹⁵⁹ Estos resultados, junto con el paso de una morfología poligonal en los CPL0-CPL3 hacia una morfología medianamente alargada en el CPL4, y finalmente el paso a una morfología totalmente alargada en los CPL5 y CPL6, indica un cambio en la población celular hacia una población más diferenciada con características propias de una población fibroblástica. Estas observaciones están en concordancia con las realizadas por Li *et al.* y con la teoría de los “LESC cores” realizada recientemente por Selver *et al.*, en la que proponen que parte de las CMEL permanecen en su nicho después de que los tejidos limbares son expandidos, lo que permitiría la expansión consecutiva de CMEL a partir de un mismo explante.^{159,160} Por otro lado, ambos grupos de investigación observaron que el número de capas celulares presentes en el epitelio limbar disminuía después de cada pase, hecho que ha sido verificado con nuestros experimentos, analizando la histología de los explantes antes y después de ser cultivados consecutivamente. Además, Li *et al.* observaron que la membrana basal se destruía parcialmente después de que los explantes llevaban en cultivo 2 semanas.¹⁵⁹ Previamente, Kawakita *et al.* demostraron que las CMEL invadían el estroma cuando se cultivaban explantes limbares de conejo.¹⁹² De la misma forma, Li *et al.* demostraron que las CMEL de los explantes limbares migraban de su nicho a través de dos fases. La primera fase consiste en la migración de las células hacia la membrana amniótica

(soporte de cultivo utilizado en ese trabajo), mientras que durante la segunda fase tenía lugar la invasión del estroma limbar por las células madre epiteliales.¹⁵⁹ Recientemente, Tan *et al.* han descrito que esta invasión intraestromal es un fenómeno que ocurre en diferentes condiciones de cultivo, no sólo en las experimentadas por Li *et al.* años atrás.¹⁹³

En este trabajo, postulamos que la presencia de células indiferenciadas en los cultivos confluentes CPL0, CPL1 y CPL2 puede ser explicada por la primera fase descrita por Li *et al.* y Tan *et al.*, durante la cual tendría lugar la migración de las CMEL desde el tejido limbar hacia el poliestireno. Esta migración podría producirse durante tres cultivos consecutivos por la presencia de los “LESC cores” descritos por Selver *et al.*¹⁶⁰ El segundo paso, la migración de las CMEL hacia el estroma, podría hacer que estas células no llegasen al sustrato de cultivo en los CPL4-CPL6. En estos cultivos, los fibroblastos o células mesenquimales del estroma limbar podrían migrar desde el tejido limbar hacia el soporte de cultivo, estableciendo cultivos primarios con células de morfología alargada que expresan las proteínas K3, K12, ABCG2 y S100A4. De acuerdo con el estudio de Selver *et al.*, hemos observado en nuestros experimentos un cambio en la morfología y tamaños de los explantes a medida que han sido cultivados consecutivamente,¹⁶⁰ sugiriendo una degradación del estroma que podría también explicar la migración de células estromales hacia el exterior del tejido.

Hace relativamente poco tiempo, se ha demostrado la presencia de células madre mesenquimales en el estroma limbar^{95,96} y, también, que las células mesenquimales de ratón procedentes de la médula ósea expresan los marcadores K3 y K12.¹⁹⁴ Además, otros estudios recientes han demostrado que las células madre mesenquimales humanas procedentes de la grasa expresan pequeñas cantidades de estos marcadores.^{190,195} Aunque evidentemente son necesarios más estudios para poder afirmar esto con certeza, creemos que las células observadas en los CPL4-CPL6 que expresan estas proteínas y que tienen una morfología alargada pueden ser células mesenquimales limbares o bien células mesenquimales procedentes de la médula ósea, ya que se ha demostrado que estas últimas tienen la capacidad de migrar al estroma corneo/limbar, especialmente cuando éste está dañado.⁹² Por otro lado, el ABCG2, un marcador propio de células madre fue expresado en los cultivos generados por los primeros pases de los explantes, probablemente por la presencia en ellos de CMEL, hecho corroborado por la presencia de células positivas para los marcadores K14, K15 y p63. Sin embargo, esta proteína fue detectada también en los CPL con células alargadas, concretamente en el CPL4. Du *et al.*, demostraron que, al igual que en otras células madre adultas, las células madre del estroma corneal y limbar expresaban este marcador.⁶³ Esto, podría explicar la presencia del marcador ABCG2 en los CPL4.

En este trabajo, se ha demostrado que los cultivos primarios desde el CPL0 hasta el CPL2 están constituidos, de forma similar entre ellos, por una población celular heterogénea, con células positivas para los marcadores típicos de CMEL (K14, K15, ABCG2 y p63), para los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas (K3 y K12) y para el marcador de fibroblastos S100A4. Esto indica la presencia de una mezcla de CMEL, células epiteliales diferenciadas y algunos fibroblastos en estos cultivos. Desde el CPL4, la presencia de células epiteliales diferenciadas y de fibroblastos comenzó a aumentar, mientras que la presencia de células indiferenciadas disminuyó significativamente. Estos resultados hacen pensar que los CPL0, CPL1 y CPL2 podrían ser utilizados como cultivos primarios homólogos entre sí en investigación básica, aumentando de esta forma el número de CPLs disponibles para realizar las investigaciones necesarias para optimizar el cultivo *in vitro* de las CMEL, así como para mejorar el conocimiento sobre la biología de las mismas.

Desde un punto de vista clínico, estos resultados sugieren que, utilizando un soporte adecuado, este protocolo podría ser trasladado a la práctica clínica. La membrana amniótica, la fibrina y/o los fibroblastos embrionarios de ratón (línea celular 3T3) cuya proliferación ha sido inhibida, son utilizados habitualmente como soporte para el crecimiento de células epiteliales limbares.¹²⁴ Sin embargo, la membrana amniótica es un tejido difícil de obtener por su origen humano y cuyo procesamiento conlleva un elevado coste, limitando su uso a estudios en los que es absolutamente necesaria. Por otro lado, el uso de 3T3 podría comprometer la traslación a la clínica de cualquier protocolo por implicar el uso de células no humanas, con el riesgo de zoonosis que esto conlleva. Para poder solventar estas limitaciones y al mismo tiempo poder trasladar los diferentes protocolos de cultivo *in vitro* de CMEL, nuestro grupo de investigación está trabajando actualmente en el desarrollo de soportes biopoliméricos para el desarrollo de un complejo CMEL-biopolímero que permita llevar a cabo de forma satisfactoria la reconstrucción del nicho limbar en pacientes afectados por SIL.¹³⁶

En la actualidad, la posibilidad de realizar un trasplante de CMEL cultivadas *in vitro* de forma exitosa depende de muchos factores, entre los que se encuentran la obtención de tejido donante de calidad, el cultivo celular, el transporte del injerto, el procedimiento quirúrgico y la aceptación del injerto por parte del receptor, así como de las posibles complicaciones postquirúrgicas desarrolladas principalmente durante las seis primeras semanas de seguimiento del trasplante. Un fallo en alguno de estos pasos determinantes implica el tener que realizar un segundo trasplante,^{131,133} para lo cual hay que buscar un nuevo tejido donante y realizar de nuevo la expansión celular con la consiguiente cirugía.

Si de entrada lo que falla es el cultivo *in vitro* de la biopsia limbar de un ojo sano para su trasplante a un ojo enfermo, se plantea la necesidad de obtener nuevamente tejido, para lo que habría que someter al ojo sano a una segunda cirugía para obtener una segunda

biopsia, con el incremento en gasto sanitario que esto supone y el riesgo de provocar SIL en el ojo donante sano, que puede ser el único ojo sano del paciente si se trata de trasplantes autólogos. Si esta posibilidad es descartada por el riesgo mencionado, entonces ha de recurrirse a una fuente de material donante de un cadáver, teniendo ya que realizarse una inmunosupresión sistémica, lo que aumenta la morbilidad del paciente y, nuevamente, el gasto sanitario.

En este contexto clínico, la obtención de varios CPL similares a partir de una única biopsia limbar tendría un impacto importante, ya que se podría generar un reservorio de CMEL cultivadas *in vitro* para cada paciente, asegurando que con una sola biopsia (una sola intervención quirúrgica) sería suficiente para obtener material para el segundo trasplante en caso de que éste fuese necesario, disminuyendo por consiguiente de forma considerable el periodo de espera entre ambos trasplantes y los costes generados (Figura 81).

Si finalmente el trasplante ha sido ejecutado con éxito y no es necesario realizar un segundo trasplante, los cultivos primarios obtenidos como reservorio celular podrían ser analizados y caracterizados, permitiendo así correlacionar las características de los cultivos trasplantados con la evolución de los pacientes.

Otra de las graves limitaciones que presenta el trasplante de CMEL cultivadas *in vitro* para el tratamiento del SIL es el uso de componentes de origen animal o compuestos potencialmente nocivos durante el cultivo de las mismas. A menudo, estos componentes se encuentran en las composiciones de los medios de cultivo utilizados, aumentando el riesgo de inducir zoonosis y/o efectos secundarios en los pacientes trasplantados. Para mejorar esta situación, hemos desarrollado un medio de cultivo sin suero de origen animal no humano y sin componentes potencialmente nocivos, el medio IOBA-SH. Posteriormente, la formulación de dicho medio de cultivo fue mejorada evitando todo tipo de compuestos animales, utilizando suplementos de origen humano, recombinantes u obtenidos mediante síntesis química. Al mismo tiempo, la formulación del medio de cultivo fue simplificada, eliminando de su composición algunos suplementos, y perfeccionada variando las concentraciones de algunos de ellos, dando lugar al medio de cultivo denominado IOBA-bioseguro.

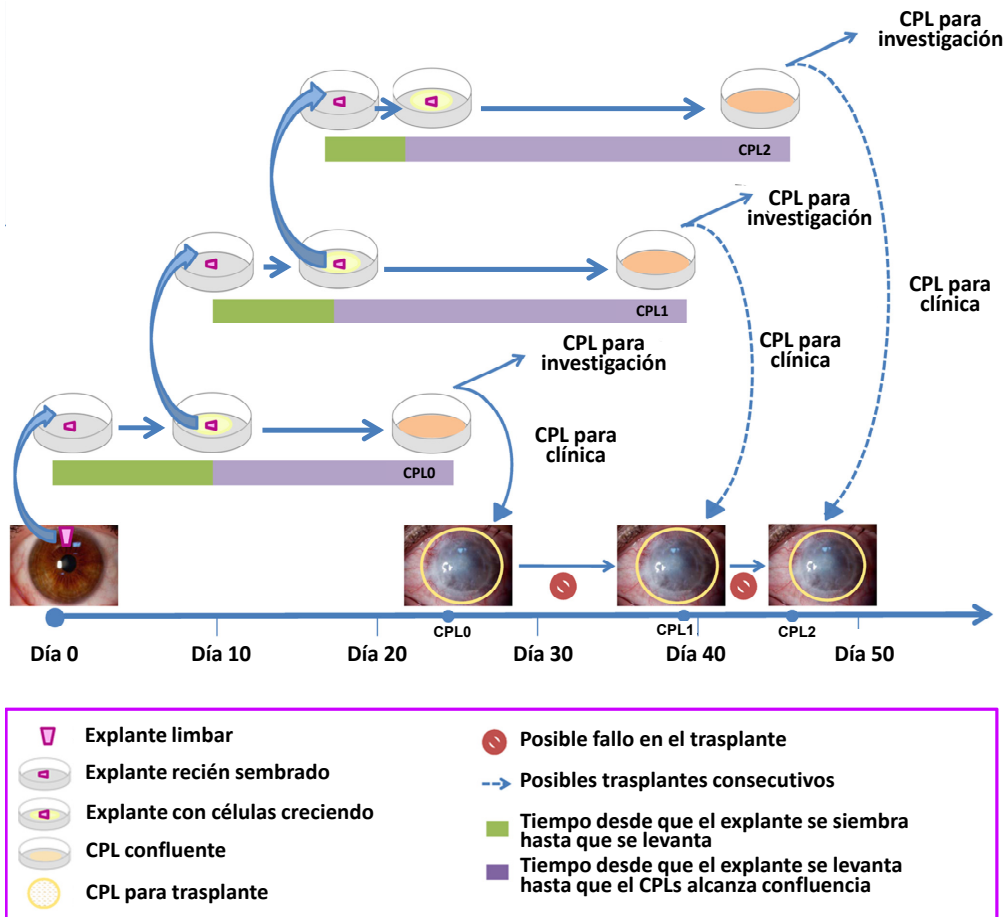


Figura 81. Posibles usos de los cultivos primarios de limbo (CPLs) obtenidos a partir de un único explante limbar. Un explante limbar puede ser cultivado de forma consecutiva obteniendo hasta tres CPLs similares entre sí. Estos CPLs se caracterizan por mantener un elevado número de células que presentan un fenotipo típico de células madre epiteliales limbares (CMEL). Este protocolo proporciona varios CPLs que pueden ser utilizados en investigación básica. Además, este protocolo podría servir para generar un reservorio de CPLs para cada paciente afectado por SIL y tratado mediante terapia celular (trasplante de CMEL cultivadas *in vitro*). Dicho reservorio de CPLs podría ser utilizado en caso de que el primer cultivo primario trasplantado (CPL0) fracasase. Si finalmente no fuese necesario realizar un segundo trasplante, éstos cultivos primarios podrían ser analizados y caracterizados, permitiendo así correlacionar las características de los cultivos trasplantados con la evolución de los pacientes.

Aunque actualmente existen varias composiciones diferentes de medios de cultivo que se utilizan para la expansión de CPLs, muchos de los suplementos utilizados son comunes en la mayoría de ellos. Actualmente, el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con gentamicina (antibacteriano) y anfotericina B (antifúngico) es el medio base más utilizado para el desarrollo de cultivos primarios de epitelio limbar.^{76,77,196,197} Además, la mayoría de los medios de cultivo están suplementados con componentes que promueven la proliferación celular *in vitro*. Generalmente, los componentes utilizados con esta finalidad son la insulina, el EGF y la hidrocortisona.^{174,198}

Otro de los compuestos utilizados normalmente para incrementar la proliferación de las células epiteliales limbares es la toxina colérica,^{128,131,132,142,144,147,148} endotoxina que puede producir la enfermedad del cólera.¹⁹⁹ Aunque el riesgo de propagación de esta enfermedad por el uso de la toxina colérica como suplemento en los medios de cultivo está reducido al mínimo, la transmisión de la enfermedad es todavía posible.¹⁴⁶ Por esta razón, en el desarrollo de la composición del nuevo medio de cultivo la toxina colérica fue sustituida por isoproterenol, compuesto que tiene un mecanismo de acción similar y que mejora la bioseguridad de los cultivos primarios obtenidos.^{138,139,141,149,182,200} ^{138,139,149,182,200} Se ha demostrado que el isoproterenol puede aumentar la proliferación de los queratinocitos humanos *in vitro* cuando se utiliza en un rango de concentración entre 10^{-5} M y 10^{-9} M, produciéndose la mayor proliferación cuando es utilizado en concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M.¹⁴⁹ Otros estudios, revelan que este compuesto puede inhibir la mitosis de este tipo celular en concentraciones de entre 10^{-8} y 10^{-11} M,²⁰¹ por lo que el medio de cultivo IOBA-SH fue suplementado con isoproterenol a una concentración de 10^{-6} M.

Sin embargo, se sabe que el efecto del isoproterenol es limitado en el tiempo,¹⁴⁹ mientras que la toxina colérica ejerce un efecto irreversible sobre la adenilato ciclasa,²⁰² por lo que otros componentes capaces de inducir la proliferación celular, como la triiodotironina (T3) y la adenina, fueron añadidos al medio de cultivo para intentar suplir el efecto reversible del isoproterenol.^{138,139,175,203} La T3 es una hormona tiroidea implicada en la regulación del metabolismo celular y en la corrección de la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular.²⁰⁴ La T3 es capaz de atravesar la membrana plasmática y posteriormente unirse a sus receptores específicos situados en la membrana nuclear de diferentes tejidos del organismo humano, donde estos actúan como un factor de transcripción dependiente de ligando.²⁰⁵⁻²⁰⁷ A través de diferentes mecanismos de regulación en la expresión de genes,²⁰⁵ se ha demostrado que la T3 activa la cicatrización de la piel²⁰⁸ y la proliferación de hepatocitos,²⁰⁹ células pancreáticas,²¹⁰ células de la médula ósea, pre-linfocitos B²¹¹ y queratinocitos de humanos,¹⁷⁵ aunque algunos estudios señalan que la T3 disminuye la proliferación de células epiteliales de mamíferos.²¹² Aunque quizás la función de la T3 de

favorecer la proliferación de células epiteliales en cultivo *in vitro* está actualmente en controversia, se ha demostrado que esta hormona inhibe la síntesis de citoqueratinas específicas de epitelios diferenciados, como K3, K5, K10 y K16, en células epiteliales corneales en cultivo, lo que hace pensar que la T3 promueve el mantenimiento de un fenotipo típico de célula epitelial indiferenciada en este tipo de cultivos.²¹³ En los estudios realizados hasta el momento para cultivar células epiteliales limbares *in vitro*, la concentración de T3 utilizada en la mayoría de ellos es de 2nM (2^{-9} M).^{128,132,214} Además, se ha demostrado que concentraciones de esta hormona de 10^{-9} M aumentan la proliferación de queratinocitos humanos cultivados *in vitro*, mientras que si se usa en concentraciones de 10^{-10} M o 10^{-11} M, este efecto disminuye.¹⁷⁵ En este contexto, consideramos que la concentración óptima de la hormona T3 para el cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares era de 10^{-9} M. Por otro lado, en los estudios realizados hasta el momento para cultivar células epiteliales limbares *in vitro* la concentración de adenina utilizada en la mayoría de ellos era de 0,18mM ($1,8 \times 10^{-4}$ M).^{128,214,215} Además, se ha demostrado que la adenina en concentración 10^{-3} M produce un ligero aumento en la mitosis celular de queratinocitos humanos.²⁰¹ Se ha descrito también que los nucleótidos de adenina producen inhibición en la proliferación de queratinocitos cuando están presentes en concentraciones menores de 10^{-4} M.²¹⁶ Por estas razones, consideramos que la mejor concentración para utilizar la adenina en la estimulación de la proliferación de células epiteliales limbares sería de 0,18 mM.

El DMSO es otro de los compuesto utilizados para el cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares. El DMSO es una molécula anfipática de bajo peso molecular, características que le permiten atravesar las membranas células. Además, es capaz de unirse a radicales libres de hidróxido, lo cual hace que juegue un papel importante frente a los radicales libres.^{151,217} Sin embargo, su uso puede inducir baja viabilidad y elevados niveles de apoptosis en el cultivo de células epiteliales, sobre todo cuando se utiliza en cantidades mayores al 0,5%.^{151,218} En el ámbito clínico, su uso está muy extendido en la criopreservación de células madre hematopoyéticas para su posterior trasplante mediante perfusión de las mismas. Se ha descrito que el DMSO involucrado en este proceso es una sustancia tóxica para el organismo humano, ya que puede provocar vasoconstricción, vómitos, problemas cardiovasculares y, en algunos casos, problemas neurológicos.^{219,220} De hecho, la supresión del DMSO antes de perfundir las células madre hematopoyéticas en los pacientes disminuye la aparición de estos síntomas.²²¹ Teniendo en cuante estas limitaciones, decidimos eliminar el DMSO en la composición del nuevo medio de cultivo, confiando que esto generaría un aumento de la proliferación celular y mejoraría la bioseguridad de los CPLs. Sin embargo, nos planteamos la posibilidad de que el equilibrio del estrés oxidativo se viese seriamente afectado y pudiese repercutir en el crecimiento celular. Por ello, se añadieron al medio de cultivo suplementos

como la transferrina y el selenio que, entre otras funciones, ayudan a combatir el estrés oxidativo celular.^{176,177}

La transferrina es una proteína encargada de transportar el hierro en la sangre, elemento necesario para llevar a cabo diferentes funciones, como mantener activos los citocromos a, b y c de la cadena respiratoria celular, actuar de cofactor en las reacciones catalizadas por la peroxidasa y estar implicado en la síntesis de nucleótidos, en el ciclo de Krebs y en el catabolismo de purinas.¹⁷⁶ Se ha demostrado, además, que su presencia es necesaria para el crecimiento de queratinocitos *in vivo*.²²² Por otro lado, el selenio forma parte de las selenoproteínas, como por ejemplo la glutatión peroxidasa, localizada en el interior celular y en el plasma sanguíneo, que accede al interior celular mediante transporte activo.¹⁷⁷ En conjunto, ambos componentes están implicados en reacciones metabólicas que mantienen en equilibrio el estrés oxidativo celular, por lo que la presencia de ambos es necesaria durante el desarrollo de cultivos celulares.^{223,224}

Como se ha comentado previamente, los medios de cultivo utilizados en el cultivo de CMEL están comúnmente suplementados con FBS, por su capacidad de aumentar la proliferación celular y de mantener el estado indiferenciado de la población celular.¹⁴⁵ Sin embargo, su uso conlleva el riesgo de zoonosis. Previamente, diferentes estudios *in vitro* e incluso ensayos clínicos han demostrado que el FBS puede ser sustituido por SH, mientras que la morfología y proliferación celular,^{132,225} así como los resultados clínicos obtenidos en los trasplantes de CMEL cultivadas *in vitro* no se ven afectados.^{132,147}

Durante los últimos años, se han desarrollado y testado diferentes medios de cultivo con la finalidad de mejorar la bioseguridad de los trasplantes de CMEL cultivadas *in vitro*. Varios grupos de investigación han desarrollado composiciones en las que la toxina colérica y el DMSO fueron eliminados, mientras que el FBS era sustituido por SH.^{137,140,154-156} Sin embargo, la eliminación de la toxina colérica y del DMSO puede disminuir la proliferación celular y comprometer el equilibrio en el estrés oxidativo, respectivamente.

En este trabajo, proponemos un medio de cultivo innovador, el medio IOBA-SH, en el que la toxina colérica, el DMSO y el FBS han sido sustituidos por componentes con mecanismos de acción similares, isoproterenol, transferrina-selenio y SH, respectivamente, para mejorar la bioseguridad de los cultivos primarios destinados a ser trasplantados. Muy recientemente, Stasi *et al.* describieron varios medios de cultivo diseñados para el crecimiento de CMEL *in vitro*, caracterizados por la ausencia de componentes de origen animal y en los que la toxina colérica fue sustituida por isoproterenol. Además, dichos medios no estaban suplementados con DMSO y sí con transferrina y selenio.¹⁴¹ La composición de uno de los medios de cultivo descrita por estos autores es muy similar a las composiciones de los medios de cultivo IOBA-

SH e IOBA-SH bioseguro, ambos desarrollados por nuestro grupo de investigación. La aparición de esta reciente publicación, pone de manifiesto el elevado interés que existe por parte de la comunidad científica en generar un medio de cultivo que, además, de no tener componentes animales, esté libre de compuestos potencialmente nocivos y que pueda ser utilizado en el cultivo de CMEL. Sin embargo, en dicho estudio, todos los cultivos fueron establecidos siempre sobre fibroblastos de origen murino y humano, demostrando solamente la eficacia de dicho medio cuando se utilizaba un soporte celular compuesto por fibroblastos, lo cual limitaba el uso de este medio a la disponibilidad de dichas células. En nuestro estudio, todos los medios de cultivo fueron testados sin utilizar fibroblastos como sustrato para las células del epitelio limbar, adquiriendo nuestro método de expansión celular un nuevo aliciente, además de la composición del medio de cultivo.

El medio de cultivo IOBA-SH fue testado en comparación con otros dos medios. Por un lado, se comparó con el medio CnT20, que es un medio de cultivo comercial diseñado específicamente para el crecimiento de CMEL y, por otro lado, con el medio de cultivo IOBA-FBS, un medio de cultivo cuya composición solo se diferencia de la del medio IOBA-SH porque lleva FBS en vez de SH.

Se cultivaron explantes limbares con los tres medios de cultivo, obteniendo cultivos primarios en los tres casos. Sin embargo, el número de cultivos que alcanzaron el estado de confluencia fue bajo en las tres condiciones, aproximadamente del 25%, de la misma forma que cuando se utilizó el medio de cultivo IOBA-toxina colérica. De nuevo, esto puede ser atribuido a las características de los tejidos limbares utilizados para el cultivo celular, como el tiempo de conservación de los mismos, la edad avanzada de los donantes y la región del anillo limbar de la que fueron obtenidos.¹⁷⁰⁻¹⁷² Además, el tiempo transcurrido para que los CPLs incubados con el medio CnT20 o IOBA-FBS alcanzasen confluencia fue mayor en nuestros experimentos que cuando otros grupos de investigación cultivaron explantes limbares con CnT20 o medios de cultivo suplementados con FBS, respectivamente.^{162,226} Sin embargo, en estos estudios se sembraron dos explantes limbares juntos, generando dos puntos diferentes de crecimiento celular en el mismo pocillo; además, la edad de los donantes y el tiempo de conservación de los tejidos limbares fueron menores que en nuestros experimentos, siendo todos ellos factores que pueden disminuir el tiempo necesario para obtener CPLs confluentes.

Por otro lado, y aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, el porcentaje de cultivos confluentes y el tiempo necesario para alcanzar dicho estado fue mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH. Sugerimos que estos resultados podrían estar relacionados con una mayor presencia de células con ciclo celular corto en los cultivos primarios obtenidos con el medio IOBA-SH, característica propia de las CMEL.⁶⁷ Por otro

lado, las células mostraron una morfología poligonal típica de células epiteliales con los tres medios de cultivo, en concordancia con la expresión detectada en dichas células de marcadores específicos de células epiteliales, como las citoqueratinas,⁴¹ y la ausencia de expresión de marcadores típicos de células endoteliales (PECAM),²²⁷ melanocitos (MART-1)⁷⁰ y células dendríticas (CD11c).²²⁸ Estos resultados sugieren que los cultivos primarios obtenidos con los tres medios de cultivo estaban compuestos principalmente por una población de células epiteliales. Sin embargo, en los cultivos obtenidos con los tres medios encontramos células expresando el marcador S100A4⁶¹ y ocasionalmente, las células presentaron además una morfología alargada, ambas características típicas de fibroblastos. Como se ha explicado anteriormente en este trabajo, la presencia de células expresando estas características también aparece en cultivos incubados con un medio de cultivo suplementado con toxina colérica, DMSO y FBS.¹³⁵ Esto, junto con las observaciones realizadas por otros grupos de investigación apuntando la aparición de células con morfología alargada en CPLs cultivados en diferentes condiciones,^{225,229} hace pensar que el medio de cultivo IOBA-SH no promueve especialmente el crecimiento de fibroblastos.

Los cultivos primarios obtenidos con los tres medios de cultivo fueron caracterizados para poder determinar si el medio IOBA-SH permitía obtener cultivos primarios con una cantidad aceptable de células que presentaran características propias de CMEL. Para ello, se analizó la expresión de los marcadores propios de CMEL (K14, K15, ABCG2, p63) y de células epiteliales corneales diferenciadas (K3 y K12). Comprobamos que solamente los cultivos primarios incubados con el medio IOBA-SH expresaron todos los marcadores propios de CMEL, mientras que los marcadores K3 y K12 fueron expresados en los cultivos incubados con los tres medios de cultivo. Además, observamos que el porcentaje de células positivas para los marcadores K14, ABCG2 y p63 fue ligeramente mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH, mientras que la expresión relativa de ARNm de estos marcadores fue significativamente mayor cuando se utilizó el medio CnT20, resultados que se repiten con el marcador K3. Aunque los resultados obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real e inmunofluorescencia no pueden ser directamente comparados como ya se ha explicado con anterioridad, se podría sugerir que esta diferencia podría deberse a una regulación post-transcripcional que podría estar bloqueando la traducción final de dichos genes,²³⁰ imposibilitando la formación de las proteínas K14, ABCG2, p63 y K3 en los CPLs obtenidos con el medio CnT20.

La K15 fue el único marcador cuya expresión fue significativamente mayor en los cultivos obtenidos con el medio IOBA-SH, tanto a nivel de expresión relativa de ARNm como a nivel proteico (porcentaje de células positivas para dicho marcador). La K15 ha sido recientemente propuesto por diferentes grupos de investigación como un marcador sólido para CMEL,^{79,188}

hecho que también ha sido corroborado por nuestro grupo de investigación en varios trabajos.^{135,231} En concordancia con esto, hemos observado a lo largo de esta tesis doctoral que la expresión de K15 está restringida en los cultivos primarios a un pequeño porcentaje de células, de acuerdo con el pequeño porcentaje de CMEL que están presentes de forma natural en el nicho limbar.⁶⁷ En este estudio, se ha demostrado que el medio IOBA-SH permite establecer CPLs en los que una pequeña parte de la población celular expresa el marcador K15, sugiriendo que el medio IOBA-SH podría promover la presencia de CMEL y el mantenimiento de su fenotipo en dichos cultivos.

Por otro lado, se compararon los cultivos obtenidos con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH, cuya composición solo difiere en el origen del suero utilizado; de esta forma se puede establecer el efecto de ambos sueros en los CPLs. Nakamura *et al.* demostraron que células epiteliales humanas cultivadas con un medio de cultivo suplementado con toxina colérica y FBS o SH tenían características *in vitro* similares.²²⁵ De acuerdo con estos resultados, en esta tesis doctoral hemos observado que la expresión de los marcadores, K14, ABCG2, p63, K3, K12 y S100A4 fue similar en los cultivos obtenidos con los medios IOBA-FBS e IOBA-SH, sugiriendo que el FBS y el SH ejercen una acción *in vitro* similar también cuando forman parte la composición de un medio de cultivo sin toxina colérica y sin DMSO. Sin embargo, la proteína K15 se expresó significativamente más en los cultivos obtenidos con el medio IOBA-SH, sugiriendo que el SH podría mantener el estado indiferenciado de las células epiteliales limbares en cultivo mejor que el FBS. De la misma forma, Takagi *et al.* analizaron el número de UFC presentes en los cultivos primarios de epitelio oral incubados con un medio suplementado con isoproterenol y FBS o SH y postularon que la toxina colérica puede ser sustituida por isoproterenol, manteniendo un buen estado de los cultivos obtenidos, especialmente cuando el medio de cultivo lleva también SH.¹³⁸

En resumen, el porcentaje de cultivos primarios confluentes y la presencia de células con un ciclo celular largo, así como el porcentaje de células positivas para las proteínas K14, ABCG2 y p63 fueron similares, o solo ligeramente mayores, cuando se usó el medio de cultivo IOBA-SH que cuando se utilizaron los medios IOBA-FBS o CnT20. La única evidencia que puede sugerir que el medio de cultivo IOBA-SH podría favorecer la presencia de CMEL en los CPLs más que los otros medios de cultivo testados es la mayor expresión del marcador K15 (tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína) en los cultivos incubados con el medio IOBA-SH.

Con estos resultados, podemos afirmar que los cultivos limbares obtenidos con el medio de cultivo IOBA-SH tienen un patrón de expresión proteico similar que cuando se usa el medio de cultivo CnT20 o, al menos, que este patrón de expresión no pone de manifiesto que las células de los cultivos obtenidos con el medio IOBA-SH estén más diferenciadas que con el medio CnT20. Además, el medio IOBA-SH tiene una composición conocida, sin suero de

origen animal ni compuestos potencialmente nocivos, lo que *a priori* le da ventajas sobre el medio CnT20, IOBA-FBS y sobre el medio de cultivo IOBA-toxina colérica, así como sobre otros medios de cultivo utilizados en la clínica humana.

Por estas razones, en este trabajo se ha explorado la posibilidad de adaptar el protocolo diseñado en el objetivo 1 para la expansión consecutiva del mismo explante limbar utilizando el medio de cultivo IOBA-SH. En los estudios descritos anteriormente en los que se cultivaron varias veces el mismo explante limbar, el medio de cultivo utilizado siempre ha estado suplementado con toxina colérica, DMSO y/o FBS.^{135,159,160} En esta parte del trabajo, hemos demostrado que el mismo explante limbar puede ser cultivado tres veces consecutivas con el medio IOBA-SH (CPL0-CPL2) y que los CPL0 y CPL1 contienen un número elevado de células que expresan marcadores propios de CMEL.

Se observó que el porcentaje de los CPL0 confluentes fue similar cuando se utilizó el medio de cultivo IOBA-toxina colérica (32%) y el medio IOBA-SH (29%). En ambas condiciones de cultivo, el porcentaje de CPLs confluentes aumentó desde el CPL0 hasta el CPL1, debido probablemente a que solo los explantes que contenían células epiteliales capaces de migrar hacia el sustrato de cultivo en CPL0 fueron sembrados en CPL1, realizando así una selección de los mejores explantes para el CPL1. Sin embargo, el aumento del porcentaje de CPLs confluentes entre el CPL0 y CPL1 solo fue estadísticamente significativo cuando se utilizó el medio IOBA-SH. Por otro lado, el tiempo que tardaron los CPL0-CPL3 en alcanzar confluencia cuando fueron incubados con el medio IOBA-toxina colérica similar. Sin embargo, cuando se utilizó el medio IOBA-SH, el tiempo que tardaron en alcanzar confluencia los CPL1 y CPL2 fue significativamente menor que el tiempo para alcanzar dicho estado en el CPL0. Estos resultados pueden sugerir que el medio de cultivo IOBA-SH promueve más la migración de células epiteliales al sustrato celular en CPL1 que el medio IOBA-toxina colérica.

Posteriormente, se analizaron los CPLs obtenidos de forma consecutiva con el medio IOBA-SH. La caracterización fenotípica (RT-PCR a tiempo real e inmunofluorescencia) confirmó la expresión de todos los marcadores propios de CMEL, así como de células corneales diferenciadas en los CPL0 y CPL1, excepto de la proteína p63 que solo fue detectada en el CPL0. Además, los cambios en la expresión relativa de ARNm o en el porcentaje de células positivas para los marcadores analizados, excepto para la expresión proteica de K12 y K14, se detectaron en el CPL2. El porcentaje de células positivas y la expresión relativa de ARNm para los marcadores K15, p63 y K3 disminuyó significativamente en el CPL2. Estos resultados, junto con el cambio de morfología observado entre los CPL0-CPL1 (células poligonales) y el CPL2 (células alargadas), sugieren un cambio en la población celular, de una población heterogénea de células epiteliales diferenciadas e indiferenciadas en el CPL0

y el CPL1, hacia una población con características típicas de fibroblastos en el CPL2. Estos resultados fueron confirmados por el aumento en el porcentaje de células positivas para el marcador S100A4, desde el CPL0 al CPL2. Por otro lado, el porcentaje de células positivas, así como la expresión relativa de ARNm del marcador ABCG2, aumentó desde el CPL0 hasta el CPL2. Un efecto similar ocurría cuando el cultivo consecutivo de explantes limbares se realizó con el medio IOBA-toxina colérica. De la misma forma, probablemente la expresión en los CPL0-CPL1 de este marcador está justificada por la presencia de CMEL,⁸⁰ mientras que la presencia del mismo en el pase CPL2 probablemente sea debida a la expresión del mismo por células madre estromales.⁶³

El conjunto de los resultado anteriores concuerda con la teoría expuesta por Li *et al* en 2007, resumida anteriormente, en la que divide la migración de las CMEL al sustrato de cultivo en dos fases.¹⁵⁹ Siguiendo esta teoría, en los CPL0 y CPL1 obtenidos de forma consecutiva con el medio IOBA-SH, las CMEL estarían migrando del tejido al sustrato, mientras que durante el CPL2 lo harían al interior estromal. Durante esta última fase, los fibroblastos y/o células madre mesenquimales podrían estar migrando del estroma limbar al sustrato,^{135,159,160,192,193} originando una población celular con morfología alargada y negativa para los marcadores proteicos K15 y p63.

En general, los resultados obtenidos de la caracterización celular coinciden con los obtenidos en el primer objetivo de la tesis. Sin embargo, cuando la expansión consecutiva de explante se realizó con el medio de cultivo IOBA-SH, el cambio en la población celular se produjo en el CPL2, observándose un cambio en la morfología celular, desde células poligonales hacia células alargadas, y una disminución en la expresión relativa de ARNm de los marcadores K14, K15 y p63 α en este CPL, mientras que estos cambios se observaron en el CPL3 o CPL4 cuando se utilizó el medio IOBA-toxina colérica. Se observó también que la expresión proteica de los marcadores típicos de CMEL K15 y p63 dejaron de detectarse en el CPL2 y CPL1, respectivamente, cuando los explantes fueron cultivados con el medio IOBA-SH, mientras que estas proteínas dejaron de expresarse en CPL4 y CPL3, respectivamente, con el medio IOBA-toxina colérica.

El cambio precoz en la población celular que genera el medio IOBA-SH puede ser debido a la ausencia de toxina colérica en el medio de cultivo, ya que varios estudios han demostrado que los queratinocitos no pueden ser subcultivados en ausencia de este compuesto.^{149,183} Sin embargo, otros componentes del medio de cultivo podrían estar involucrados en el cambio precoz de la población celular que tiene lugar en los CPLs consecutivos incubados con el medio IOBA-SH, por lo que sería necesaria la realización de más estudios para poder afirmar que fue debido a la ausencia de toxina colérica en el medio de cultivo.

zoonosis, aunque disminuído, seguía presente. Para mejorar la composición de este medio, la insulina bovina fue sustituida por insulina recombinante, de tal forma que todos los componentes utilizados eran de origen humano (suero), recombinante (EGF e insulina) o procedentes de síntesis química (isoproterenol, adenina, hidrocortisona y T3), dando lugar al medio IOBA-bioseguro. Estos cambios no deberían alterar el efecto del medio de cultivo sobre los CPLs, ya que cada compuesto ejercía el mismo efecto, independientemente de su origen.

Además, la composición del medio IOBA-SH se simplificó eliminando la transferrina y el selenio. Como se ha explicado con anterioridad, ambos componentes están implicados en reacciones metabólicas que mantienen en equilibrio el estrés oxidativo celular, por lo que la presencia de ambos es necesaria durante el desarrollo de los cultivos celulares.^{223,224} No obstante, estudios recientes han demostrado que el suero sanguíneo aporta la cantidad suficiente de compuestos antioxidantes necesarios para el crecimiento celular *in vitro*,^{138,232} por lo que si los medios de cultivo utilizados ya contienen algún tipo de suero no es necesario aportar transferrina y selenio de forma adicional.

Por otro lado, las concentraciones de algunos de los suplementos utilizados en el medio IOBA-SH fueron modificadas para el diseño del medio IOBA-bioseguro. Una de las concentraciones que se varió fue la de la insulina. La insulina es un péptido capaz de aumentar la proliferación e inhibir la apoptosis de queratinocitos cultivados *in vitro*, además de favorecer la cicatrización de fisuras epiteliales y de no inducir diferenciación celular.^{174,233} Estos procesos se realizan a través de un mecanismo de acción que tiene su origen en los receptores de insulina, cuya presencia se ha demostrado ya en la superficie ocular.^{234,235} La insulina se une a sus receptores específicos, produciéndose la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), activando e inhibiendo diversos procesos celulares.²³⁶ En la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento, la concentración de insulina utilizada para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares es de 5 µg/ml^{131,132,162} o de 10 µg/ml,⁷⁹ aunque algunos autores llegan a utilizar concentraciones de 5 mg/ml.¹⁸⁴ En queratinocitos humanos orales, se ha demostrado mayor eficacia de ese compuesto cuando se utiliza en un rango de concentraciones entre 2 y 10 µg/ml, produciéndose el mayor aumento de proliferación celular con 5 µg/ml.¹⁷⁵ También se ha descrito que esta concentración es adecuada en el cultivo *in vitro* de la línea celular HCE, proporcionando un aumento en la proliferación celular.²³⁷ En este contexto, consideramos que la insulina podía utilizarse de forma segura (sin citotoxicidad y produciendo un aumento considerable de la proliferación celular) para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares humanas en un rango de concentración que iba desde 2 hasta 10 µg/ml. Tanto el medio de cultivo IOBA-toxina colérica, IOBA-FBS, IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro fueron

suplementados con una concentración de insulina establecida dentro de estos rangos. Sin embargo, en base a los datos publicados en la bibliografía, los cuales que parecían indicar que la concentración de EGF más efectiva para esta aplicación era 5 µg/ml, decidimos suplementar el medio IOBA-SH bioseguro con esta concentración de insulina, en vez de con 10 µg/ml como se hizo en el resto de medios.

Otro de los componentes cuya concentración fue modificada en el medio IOBA-bioseguro fue el EGF. El EGF es un compuesto implicado en la proliferación celular. Actualmente, se sabe que el EGF comienza su mecanismo de acción en la célula diana cuando se une al EGFR (*epithelial growth factor receptor*, receptor específico para EGF).^{238,176} La señalización a través del EGFR es crucial en el desarrollo embrionario, en la diferenciación hacia células epiteliales, la proliferación y la organogénesis.²³⁹ En ausencia de ligandos, los EGFRs residen en la membrana de forma inactiva. Cuando el EGF se une al EGFR, se produce la dimerización de éste, que activa la ruta de señalización Ras/MAPK, activando la quinasa erk MAPK (*extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos), capaz de trasladarse al núcleo y activar genes que participan en la proliferación celular.²³⁹ Otra vía importante tras la activación del EGFR es la de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*, fosfoinositol 3-quinasa), la cual genera señales para la supervivencia celular y previene la apoptosis.²³⁹ Además, se ha descrito que en células epiteliales corneales la activación de los EGFR controla la proliferación celular por medio de la activación de canales de calcio y del intercambio Na-H.^{240,241} En la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento la concentración de EGF utilizada para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares oscila entre 5 ng/ml^{11,27} y hasta 10 ng/ml,^{131,132} aunque, en algunos casos, las concentraciones utilizadas están fuera de este rango (2 ó 20 ng/ml).^{184,214} Estudios iniciales demostraron que el EGF aumenta la proliferación de células epiteliales limbares humanas en cultivo cuando éste es utilizado en concentraciones entre 5 ng/ml y 50 ng/ml, produciéndose un mayor aumento en la proliferación celular cuando es usado entre 5 y 25 ng/ml.²⁴² Posteriormente, se demostró que este aumento de proliferación celular se produce también hasta con 100 ng/ml de EGF, aunque el rango de mayor aumento seguía siendo aproximadamente el mismo.²⁴³ Estudios muy recientes han demostrado que el máximo rango de proliferación celular en este tipo celular concreto se produce a 5 ó 10 ng/ml de EGF.^{141,244} Además, se ha demostrado que a estas concentraciones la proliferación de fibroblastos corneales humanos es baja y que las células epiteliales limbares de conejo presentan un ciclo celular más largo.^{242,245} En este contexto, consideramos que el EGF podía utilizarse de forma segura (sin citotoxicidad y produciendo un aumento considerable de la proliferación celular) para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares humanas en un amplio rango de concentración que va desde **2 hasta 100 ng/ml**. Los cuatro medios de cultivo diferentes utilizados en esta tesis para el cultivo de células epiteliales

limbares fueron suplementados con una concentración de EGF establecida dentro de estos rangos. Sin embargo, en base a los datos publicados en la bibliografía, los cuales parecían indicar que la concentración de EGF más efectiva para esta aplicación era 5 ng/ml, decidimos suplementar el medio IOBA-SH bioseguro con esta concentración de EGF, en vez con 2,5 ng/ml, concentración utilizada en los medios IOBA-toxina colérica, IOBA-FBS e IOBA-SH.

El último de los compuestos en los que se modificó la concentración final en el medio IOBA-bioseguro fue la hidrocortisona. La hidrocortisona es un compuesto glucocorticoide, cuyo mecanismo de acción comienza con la entrada de la molécula al citoplasma celular mediante transporte pasivo, donde se une de forma específica a sus receptores citoplasmáticos.²⁴⁶ Este conjunto receptor-hidrocortisona entra en el núcleo celular uniéndose a regiones específicas de DNA (elementos de respuesta a glucocorticoides), interfiriendo con la activación de otros factores de transcripción, como el AP-1, que está involucrado en la proliferación celular.²⁴⁷ En la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento la concentración de hidrocortisona utilizada para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares es de 0,4 µg/ml^{131,132} ó 0,5 µg/ml²⁴⁸ aunque, en ocasiones, la concentración de hidrocortisona utilizada para la expansión *in vitro* de este tipo celular asciende hasta los 500 µg/ml.¹⁸⁴¹ Inicialmente, se demostró que la hidrocortisona ejerce efectos sobre el cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos aumentando la proliferación cuando se utilizaba a una concentración de 0,4 µg/ml. Además, se demostró que utilizada en esta concentración no promovía la estratificación celular.¹⁹⁸ Actualmente, se conoce que la hidrocortisona aumenta la proliferación celular en queratinocitos humanos en cultivo *in vitro* cuando se usa en un rango de concentración entre 0,4 y 10 µg/ml.^{175,198} En este contexto, consideramos que la hidrocortisona puede utilizarse de forma segura (sin citotoxicidad y produciendo un aumento considerable de la proliferación celular) para la expansión y cultivo *in vitro* de células epiteliales limbares humanas en un rango de concentración que iba desde 0,4 hasta 10 µg/ml, siendo la concentración más utilizada por diferentes autores 0,4 µg/ml. Por ello, la concentración utilizada en los medios IOBA-toxina colérica, IOBA-FBS e IOBA-SH (0,5 µg/ml, dentro del rango establecido) fue modificada hasta 0,4 µg/ml en el medio IOBA-SH bioseguro.

Con estas modificaciones, se estableció un medio de cultivo más simple que el medio IOBA-SH, sin ningún compuesto de origen animal y sin componentes potencialmente nocivos, originando así un medio de cultivo que garantiza la bioseguridad de losCPLs, denominado IOBA-SH bioseguro. Este medio de cultivo fue utilizado en el último objetivo de este trabajo de investigación, con la intención de afianzar su validez para el cultivo de CMEL, así como de testar el uso del mismo con diferentes técnicas de aislamiento celular.

Parte de los resultados obtenidos a lo largo del tercer objetivo nos han permitido establecer que el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro proporciona un mejor rendimiento *in vitro* de los explantes limbares que el medio IOBA-SH, ya que permite establecer más CPLs confluentes en menos tiempo. Por otro lado, la morfología y el tamaño celular adquirido por las células cultivadas con los dos medios de cultivo fue similar, mientras que el porcentaje de células positivas para las proteínas propias de CMEL, K14, K15 y ABCG2, fue considerablemente mayor cuando se utilizó el medio IOBA-SH bioseguro. Por otro lado, los CPLs incubados con el medio IOBA-SH expresaron la proteína p63; sin embargo, cuando esta proteína no fue detectada en los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH bioseguro. Probablemente, estos resultados sean debidos a que en el primer caso se utilizó un anticuerpo capaz de reconocer todas las isoformas diferentes del factor de transcripción p63,⁸¹ mientras que en el segundo caso el anticuerpo utilizado era específico para la isoforma p63 α , expresada de forma más específica por las CMEL.⁸² Podría ser que en los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH bioseguro, al igual que se ha comprobado en los CPLs obtenidos con el medio IOBA-SH, se estén expresando isoformas de la proteína p63 que no se han detectado con el anticuerpo utilizado. Además, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia en los CPLs incubados con ambos medios de cultivo no son directamente comparables, ya que la forma de preparar las muestras para realizar la técnica era diferente. Las células de los CPLs incubados con los medios IOBA-SH y CnT20, así como con los medios IOBA-toxina colérica e IOBA-FBS, fueron levantadas del sustrato de cultivo, sembradas en placas multipocillo donde permanecieron toda la noche y posteriormente fijadas. Durante este proceso, pudimos observar que en los casos en los que el medio no estaba suplementado con FBS (CnT20 e IOBA-SH) se adherían menos células al sustrato que cuando el medio contenía FBS, por lo que pensamos que parte de las células podrían no haber sido analizadas. Por otro lado, las células obtenidas a partir de los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH bioseguro fueron centrifugadas y fijadas directamente, lo que nos hace creer que, en este caso, todas las células fueron analizadas. Esta metodología fue posteriormente corregida en el desarrollo del tercer objetivo de la tesis. Por otro lado, cuando se analizaron los datos obtenidos mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real, se observó que los CPLs obtenidos con el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro expresaban más cantidad de ARNm correspondiente a marcadores propios de CMEL que los CPLs incubados con el medio IOBA-SH. Con estos resultados, podemos afirmar que en los CPLs cultivados con el medio IOBA-SH bioseguro existe mayor expresión de ARNm propio de CMEL que cuando los CPLs son incubados con el medio IOBA-SH, afianzando las ventajas del IOBA-SH bioseguro sobre este último.

Debido a que la composición del medio IOBA-SH bioseguro presentaba ventajas sobre la composición del medio IOBA-SH, como se ha descrito anteriormente, y a los buenos resultados obtenidos con este medio demostrados en los objetivos dos y tres, se estableció

este medio de cultivo como más idóneo para el cultivo bioseguro de CMEL in vitro. Por ello, el medio IOBA-SH bioseguro fue utilizado para el desarrollo del objetivo 3.

El último objetivo desarrollado en esta tesis doctoral consistió en la comparación de las dos técnicas más utilizadas actualmente para aislar las CMEL del nicho limbar. Una de las técnicas consiste en la realización y cultivo de explantes limbares, mientras que la otra consiste en la obtención de células en suspensión y la posterior siembra de las mismas (suspensiones celulares).¹²⁴ Actualmente, se conocen las ventajas y desventajas que ofrecen cada una de ellas de forma teórica y, además, varios estudios han intentado establecer las semejanzas y diferencias entre los cultivos obtenidos con ambas técnicas.^{161-163,229,249,249} En ninguno de estos estudios se han observado grandes diferencias entre una técnica y otra. Sin embargo, en dichos trabajos, la caracterización realizada de los cultivos ha estado limitada principalmente al estudio de la expresión de diferentes marcadores, sin analizar la funcionalidad de las células, factor que se analizó en esta tesis doctoral mediante los ensayos de clonogenicidad. Además, en los estudios previos en los que se compara la técnica de explantes limbares con las suspensiones celulares, el medio de cultivo utilizado estaba suplementado con suero de origen animal y en la mayoría de los casos con toxina colérica. Con el desarrollo de este objetivo, como parte de esta tesis doctoral, pretendemos establecer qué método de aislamiento de CMEL ofrece mejores resultados en unas condiciones de posible traslación a la clínica humana, utilizando un medio de cultivo bioseguro. Por otro lado, los resultados obtenidos a lo largo de este objetivo permitieron realizar una comparación de los medios IOBA-SH e IOBA-SH bioseguro.

Para llevar a cabo este objetivo, se cultivaron inicialmente 208 explantes y 61 suspensiones celulares, procedentes de 17 y 18 donantes respectivamente. La media de cultivos primarios establecidos a partir de medio anillo limbar mediante la técnica de explantes fue de nueve, de los cuales el 40% llegó a confluencia, mientras que a partir de suspensiones celulares se pudieron establecer solamente dos cultivos a partir de medio anillo limbar, de los que el 95% alcanzaron el estado confluyente. En definitiva, a partir de medio anillo limbar, con las condiciones de cultivo establecidas en este trabajo y a partir de los datos explicados, se consiguió una media de cuatro cultivos confluentes a partir de explantes y de dos a partir de suspensiones celulares. Aunque aislando las células limbares a partir de explantes se pueden iniciar cuatro veces más cultivos primarios que a partir suspensiones celulares, hemos observado que el número de cultivos confluentes solo es dos veces mayor con explantes que son suspensiones celulares. Pensamos que el bajo porcentaje de éxito de los cultivos establecidos a partir de explantes puede estar directamente afectado por la avanzada edad de los donantes de tejido limbar, así como por el hecho de proceder de donantes cadáver,¹⁷⁰⁻¹⁷² como hemos observado a lo largo del desarrollo de todos los

experimentos que forman parte de esta tesis doctoral. Estos parámetros también afectan a los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, ya que una escasa calidad de los tejidos repercute en el número de células que se pueden obtener y, por tanto en el número de cultivos primarios que se pueden iniciar. Otro factor que puede estar influyendo en el porcentaje de cultivos confluentes obtenidos a partir de explantes es la región del anillo limbar de la que se han extraído los tejidos. En estos experimentos, al igual que en los objetivos anteriores, los explantes limbares se han tomado de todo el anillo limbar.¹⁷³ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un estudio en el que se ha demostrado que cultivando explantes tomados solamente de la región superior de los anillos limbares, con el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro, el porcentaje de CPLs confluentes aumentó hasta el 58%, presentado además estos CPLs un porcentaje mayor de células que expresaban los marcadores de CMEL K15 y ABCG2.¹³⁶ Sin embargo, esta mejora en el porcentaje de CPLs confluentes no se puede atribuir exclusivamente a la región limbar de la que se recogieron los explantes, ya que en el citado estudio, la superficie de cultivo celular fue menor (1 cm²) que en los experimentos realizados en esta tesis doctoral. Aunque son necesarios más estudios para poder demostrar que la región de la que se ha tomado los explantes está afectando de forma significativa al porcentaje de CPLs confluentes, creemos que este factor está teniendo un peso importante en nuestros resultados. Sin embargo, en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, existe una mezcla de células procedentes de las distintas regiones, por lo que este factor no afecta a estos cultivos. Podría ser que los cultivos primarios iniciados a partir de explantes que no llegan a alcanzar el estado de confluencia sean los que proceden de regiones limbares con baja cantidad de células indiferenciadas. Sin embargo, serían necesarios más experimentos para confirmar esto. Desde este punto de vista, los resultados de rendimiento de los cultivos primarios obtenidos en este objetivo no son comparables con lo que sucedería en la práctica clínica, donde los tejidos limbares proceden de donantes generalmente jóvenes y, en algunos casos, de donantes vivos. Además, las biospias (explantes limbares) son extraídas en la mayoría de los casos de la región superior o inferior del anillo limbar del donante.

Por otro lado, hemos observado que los cultivos obtenidos a partir de explantes tardaron más tiempo en alcanzar confluencia (19 días) que a partir de suspensiones celulares (13 días), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En un estudio similar, aunque en condiciones de cultivo diferentes, Kim *et al.* describieron que los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes tardaban en alcanzar confluencia entre 14 y 21 días, mientras que los cultivos que procedían de suspensiones celulares alcanzaban dicho estado en un tiempo entre 10 y 14 días, datos que coinciden con los obtenidos en esta tesis doctoral. Sin embargo, en el citado estudio, los autores sembraron dos explantes en cada pocillo y las suspensiones celulares fueron establecidas sobre 3T3,¹⁶² mientras que nosotros sembramos 1 explante por

pocillo y las suspensiones celulares fueron realizadas directamente sobre poliestireno. Estos factores podrían provocar que los cultivos primarios tardasen más tiempo en alcanzar confluencia en nuestros experimentos, ya que en los explantes solo hay un tejido a partir del cual puede comenzar el crecimiento celular y, en el caso de las suspensiones celulares, las células no están estimuladas por los 3T3, que favorecen el crecimiento de las mismas.^{97,191} Sin embargo, estos factores no afectaron negativamente al desarrollo de los cultivos, hecho que podría ser atribuido al medio de cultivo utilizado. Al contrario que el medio de cultivo usado en nuestros experimentos, el medio utilizado por Kim *et al.* estaba suplementado con FBS, toxina colérica y DMSO, lo que nos hace pensar que el medio IOBA-SH bioseguro puede ejercer un efecto positivo en el proceso de establecer CPLs, tanto si establecen a partir de explantes como a partir de suspensiones celulares, frente a otros medios. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para poder demostrar esto fehacientemente. Por otro lado, el hecho de que los cultivos obtenidos a partir de explantes tarden más tiempo en alcanzar confluencia puede hacer pensar que en estos cultivos hay más células con ciclo celular largo, característica de las CMLE. No obstante, creemos que probablemente esta diferencia sea debida al tiempo que necesitan las células para empezar a salir desde el explante limbar hacia el plástico (nueve días), tiempo que no es necesario en los cultivos establecidos a partir de suspensiones celulares. Además, Kim *et al.*, demostraron, aunque con otras condiciones de cultivo diferentes, que la presencia de células con ciclo celular largo fue mayor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares.¹⁶²

Por otro lado, el tiempo que tardan en alcanzar confluencia los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares varía de forma directamente proporcional al número de células sembradas, por lo que el tiempo estimado puede cambiar al modificar este parámetro. En nuestro caso, sembramos 15.000 células/cm², basándonos en varios trabajos publicados por diferentes autores,^{167,250} a pesar de que en la mayoría de los casos las suspensiones celulares eran cultivadas sobre 3T3. Además, se probaron diferentes concentraciones celulares en nuestro laboratorio para establecer este tipo de cultivos primarios (datos no mostrados), proporcionando esta concentración celular la mejor relación cantidad de células empleadas/crecimiento establecido. El tiempo necesario para alcanzar confluencia a partir de un explante es más estándar, aunque éste puede disminuir significativamente si el tejido es previamente tratado con dispasa, como demostró Zhang *et al.*¹⁶³

Otra diferencia que encontramos entre los cultivos obtenidos a partir de estas técnicas es el número de células presentes en los cultivos confluentes, siendo éste significativamente mayor cuando los cultivos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares. Esto concuerda con la morfología celular ya que, aunque en ambos casos la población celular presentó una

morfología poligonal típica de células epiteliales, el tamaño celular fue menor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, lo que permite mayor densidad celular (número de células/cm²). Este hecho fue también demostrado por Kim *et al.*, quienes describieron la presencia de células más pequeñas y compactas en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares.¹⁶² La presencia de células con un tamaño significativamente menor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares sugiere la mayor presencia de CMEL en este tipo de cultivos.^{45,251,252}

Por otro lado, se analizó la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica de transmisión. Schlötzer-Schrehardt *et al.* observaron mediante esta técnica la presencia de paquetes celulares en el fondo de las empalizadas de Vogt de tejidos limbares humanos, en las que distinguieron dos tipos celulares. Por un lado, describieron la presencia de células pequeñas, con un elevado ratio núcleo-citoplasma, nucléolos poco marcados, pocos orgánulos y pocos filamentos intermedios, que identificaron como células indiferenciadas; y por otro, observaron células de mayor tamaño, con elevada cantidad de eucromatina, nucléolos marcados, con elevada cantidad de gránulos de melanina, así como de filamentos intermedios. Además, estas células presentaban gran cantidad de uniones intercelulares tipo desmosoma, los cuales están compuestos principalmente por cadherinas, moléculas que se expresan de forma más importante en las células epiteliales corneales que en las CMEL.^{44,45} Estas células fueron identificadas como células amplificadas transitorias.⁴⁵ En nuestros experimentos, hemos observado que las células de los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares presentaron características similares. Las células presentaron un citoplasma pobre en orgánulos, característica típica de células poco diferenciadas. Sin embargo, presentaron nucléolos bien definidos, una elevada cantidad de filamentos intermedios y numerosas uniones intercelulares, principalmente desmosomas, características propias de células diferenciadas.⁴⁵ Estas características, junto con la ausencia de un elevado ratio núcleo/citoplasma⁴⁵ sugieren que la mayor parte de la población celular de ambos tipos de cultivos primarios limbares estaba formada por células transitorias, que tienen características tanto de CMEL como de células diferenciadas.⁴⁵ Por otro lado, Koizumi *et al.* demostraron que los cultivos celulares limbares estratificados obtenidos a partir de explantes sobre membrana amniótica presentaban espacios intercelulares mayores que cuando los cultivos eran obtenidos a partir de suspensiones celulares,¹⁶¹ hecho que nosotros también hemos observado. Además, dicho grupo de investigación describió la presencia de largas prolongaciones celulares que terminaban en uniones tipo desmosomas,¹⁶¹ características que hemos podido observar también en nuestros experimentos, principalmente en los cultivos obtenidos a partir de explantes. Además, se observó la presencia de lisosomas primarios en los CPLs obtenidos con ambas técnicas, lo que puede sugerir la presencia de factores que pueden estar induciendo estrés celular.

La morfología poligonal de las células, demostrada mediante microscopía óptica y electrónica, fue confirmada mediante el análisis de la expresión de citoqueratinas en dichas células,⁴¹ así como por la ausencia de células que expresaban marcadores típicos de células endoteliales (PECAM), melanocitos (MART-1) y células dendríticas (CD11c). Sin embargo, se observó un pequeño porcentaje de células que expresaban el marcador S100A4, propio de fibroblastos. La expresión de este marcador fue mayor en los cultivos obtenidos a partir de explantes, tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm, aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el último caso. Estos resultados indican que ambos tipos de cultivos celulares están formados principalmente por una población de células epiteliales, entre las que se pueden encontrar algunos fibroblastos y que estos están más presentes en los cultivos obtenidos a partir de explantes, debido probablemente a que en este caso puede haber una migración de fibroblastos estromales hacia el sustrato durante todo el tiempo que dura el cultivo.

Para terminar de caracterizar los cultivos primarios obtenidos a partir de ambas técnicas de aislamiento celular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y RT-PCR a tiempo real de marcadores propios de CMEL y células epiteliales corneales diferenciadas. Observamos que la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de CMEL fue similar (K14 y ABCG2) en los cultivos obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares o mayor (K15) en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares. Solamente la expresión relativa de ARNm del marcador de CMEL p63 α fue mayor en los cultivos obtenidos mediante explantes limbares. Además, el porcentaje de células que expresaron las proteínas propias de CMEL (K14, K15, ABCG2 y p63 α) fue mayor en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para los marcadores K14 y K15, teniendo también en cuenta que la proteína p63 α no fue detectada en los cultivos obtenidos a partir de explantes. Estos resultados sugieren que en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares hay mayor cantidad de células que expresan un fenotipo celular típico de CMEL que cuando los cultivos son realizados a partir de explantes. Zhang *et al.*, demostraron que las células epiteliales limbares de conejo cultivadas *in vitro* en monocapa a partir de suspensiones celulares expresaron más el marcador Δ Np63 que cuando se cultivaron a partir de explantes,¹⁶³ resultados que concuerdan con los nuestros. Sin embargo, Kim *et al.* demostraron que la expresión del marcador p63 fue similar en los cultivos en monocapa obtenidos por ambas técnicas. Esto puede ser debido a que las condiciones de cultivo utilizadas entre los diferentes estudios, incluyendo el nuestro, no son iguales. Además, Kim *et al.* analizaron la expresión de todas la isoformas del marcador p63, mientras que Zhang *et al.* analizó, al igual que es esta tesis doctoral, la expresión de isoformas específicas para CMEL, en concreto las isoformas Δ Np63 y la p63 α ,

respectivamente⁸² cuya expresión parece verse favorecida en los cultivos obtenidos mediante suspensiones celulares.

Por otro lado, se demostró que no hubo diferencias significativas en la expresión relativa de ARNm, ni en el porcentaje de células positivas para los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas (K3 y K12) entre los cultivos obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares, confirmando la presencia de células diferenciadas en ambos tipos de cultivos. De la misma forma, Koizumi *et al.* demostraron que estos marcadores fueron expresados por igual en cultivos primarios limbares expandidos sobre membrana amniótica a partir de explantes y de suspensiones celulares,¹⁶¹ hecho también confirmado para el marcador K3 por Kim *et al.*¹⁶²

Los resultados de la caracterización celular sugieren que en ambos tipos de cultivos primarios existe una población heterogénea de células epiteliales indiferenciadas y diferenciadas, que expresa marcadores propios de CMEL y de células epiteliales corneales, respectivamente. Además, se ha calculado, haciendo la media del porcentaje de células que expresan los marcadores K14, K15, ABCG2 y p63 α , que aproximadamente el 35% de las células procedentes de cultivos obtenidos mediante explantes expresan marcadores propios de CMEL, mientras que en los CPLs obtenidos a partir de suspensiones celulares este porcentaje se estimó que es del 70%. Por otro lado, se ha calculado, haciendo la media del porcentaje de células que expresan los marcadores K3 y K12, que aproximadamente el 60% de las células en ambos tipos de CPLs expresan marcadores propios de células epiteliales corneales diferenciadas. Con estas estimaciones, podemos deducir que al menos en los cultivos observados a partir de suspensiones celulares existe una población celular que expresa a la vez ambos tipos de marcadores, sugiriendo la presencia de células transitorias, resultados que concuerdan con los obtenidos en la microscopía electrónica de transmisión.

Para analizar la funcionalidad de las células en los cultivos primarios confluentes obtenidos a partir de explantes y de suspensiones celulares utilizando el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro, se analizó la capacidad celular para originar nuevas colonias (análisis del número de UFC), así como la capacidad celular de originar holoclonos, meroclonos y paraclones para confirmar la presencia o no de células funcionales indiferenciadas, transitorias y diferenciadas, respectivamente, siguiendo la metodología establecida por Barrandon *et al.*⁸⁷ Observamos que en los cultivos confluentes obtenidos a partir de suspensiones celulares había mayor número de UFC (8%) que en los cultivos confluentes a partir de explantes (1%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con la mayor presencia de células que expresan marcadores propios de células indiferenciadas en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, ya que las células indiferenciadas limbares tienen mayor capacidad de proliferación y clonogénica que las corneales

diferenciadas.^{76,86} Los porcentajes obtenidos de UFC, sobre todo en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, son similares a los encontrados en otros estudios en los que las condiciones de cultivo incluían medios de cultivo con FBS y toxina colérica y el uso de fibroblastos 3T3 como sustrato celular, lo que indica que nuestra técnica de cultivo permite mantener la clonogenicidad celular, especialmente cuando los cultivos son establecidos a partir de suspensiones celulares.^{167,250}

Por otro lado, observamos que todas las colonias formadas por los cultivos primarios obtenidos a partir de explantes eran paraclones, mientras que en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares este porcentaje disminuyó al 90%, siendo el 10% restante colonias de tipo meroclón. Hemos observado que en nuestros experimentos, el porcentaje de colonias tipo meroclón obtenido es muy bajo, siendo inexistente el porcentaje de colonias tipo holoclón. Siguiendo una metodología similar, Pellegrini *et al.* demostraron que la mayoría de los clones obtenidos de cultivos de epitelio limbar establecidos a partir de suspensiones celulares sobre fibroblastos 3T3 eran meroclonos (70%), mientras que solamente el 20% eran holoclonos y el 10% paraclones.⁸⁶ Notara *et al.*, demostraron también una elevada presencia meroclonos en cultivos de epitelio limbar humano. En este estudio, los cultivos se realizaron también a partir de suspensiones celulares y sobre 3T3. Además, en ambos estudios se utilizaron tejidos procedentes de donantes dentro de un rango de edad entre 50 y 60 años y en el trabajo realizado por Pellegrini *et al.* los tejidos utilizados procedían de la región superior del anillo limbar.¹⁶⁷ Estos factores pueden ser los que estén determinando las diferencias entre los resultados que nosotros hemos obtenido y los que describen otros autores, ya que el uso de tejidos de la zona superior limbar y procedentes de donantes jóvenes aumenta la probabilidad de tener células indiferenciadas en cultivo.^{171,173} Además, creemos que nuestros experimentos pueden estar limitados por el número de colonias subcultivadas para determinar su naturaleza de holoclón, meroclón o paraclón, ya que según determinaron Pellegrini *et al.*, realizando estudios en los que subcultivaban 30 colonias, la probabilidad de encontrar un holoclón es de 1/20⁸⁶ y nosotros subcultivamos solamente 10 colonias debido a limitaciones de logísticas, por lo que podríamos no estar detectando holoclonos o meroclonos aunque éstos estén presentes en los cultivos. Sin embargo, pensamos que experimentos adicionales en los que se aumentase el número de colonias subcultivadas aumentaría el número de colonias tipo meroclón y, probablemente, también el número de colonias tipo holoclón.

Pero, sin duda, el factor que más está influyendo en esto los resultados es el uso de fibroblastos 3T3 como sustrato celular, lo cual favorece el mantenimiento de las células indiferenciadas en cultivo.^{97,191} A la vista de estos resultados, se puede dar peso a la importancia de utilizar células estromales en co-cultivo con las células epiteliales limbares

para mantener el fenotipo indiferenciado de estas últimas. Sin embargo, nuestro grupo de investigación está intentado eliminar el uso de componentes animales durante el proceso de cultivo y trasplante de los CPLs, por lo que, desde un inicio, decidimos no usar fibroblastos murinos 3T3. No obstante, actualmente, hay grupos que están desarrollando la idea de utilizar fibroblastos humanos o células mesenquimales como sustrato celular^{141,250,253} y nuestro propio grupo de investigación está desarrollando un soporte biopolimérico capaz de promover la proliferación de CMEL, soluciones que creemos que mejorarán los resultados de funcionalidad de nuestros cultivos.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, con los resultados obtenidos podemos asegurar que en los cultivos establecidos a partir de suspensiones celulares hay una mezcla de meroclones y paraclones, que indica la presencia de células diferenciadas y transitorias respectivamente, así como que en los cultivos obtenidos a partir de explantes la presencia de meroclones es significativamente menor que cuando los cultivos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares. Estos resultados concuerdan con el menor tamaño de las células y el mayor porcentaje de células expresando las proteínas K14, K15, ABCG2 y p63 α que encontramos en los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares, características propias de CMEL.

Estos resultados demuestran que los CPLs obtenidos a partir suspensiones celulares, en las condiciones aquí establecidas, presentan un número mayor de células con características propias de CMEL o células epiteliales limbares transitorias que cuando los cultivos son obtenidos a partir de explantes limbares.

En resumen, durante el desarrollo de este trabajo, se ha demostrado que es posible optimizar los procedimientos utilizados actualmente para el cultivo *in vitro* de CMEL.

En primer lugar, se ha demostrado que es posible cultivar de forma consecutiva el mismo tejido limbar, obteniendo hasta tres CPLs homólogos entre sí que mantienen un elevado número de células con fenotipo típico de células madre epiteliales limbares. Este protocolo proporciona varios CPLs que pueden ser utilizados en investigación básica y que, además, utilizando un soporte adecuado, podrían servir para generar un reservorio de cultivos primarios para cada paciente afectado por SIL y tratado con un trasplante de células madre epiteliales limbares cultivadas *in vitro*. Sin embargo, este protocolo se puso a punto con un medio de cultivo que limitaba la posible traslación del mismo a la práctica clínica.

Por otro lado, hemos demostrado que se pueden obtener CPLs que presentan un porcentaje de CMEL utilizando un medio de cultivo sin componentes animales y sin componentes potencialmente nocivos para el organismo humano, mejorando la bioseguridad de los CPLs

que podrían ser utilizados en un posible trasplante en la práctica clínica humana. Este medio de cultivo permite, además, explandar hasta dos veces consecutivas el mismo explante, lo que facilitaría la traslación del protocolo anteriormente descrito a la clínica humana.

Finalmente, hemos podido verificar que las células epiteliales del tejido limbar aisladas mediante la técnica de suspensiones celulares permiten establecer CPLs con un número más elevado de células con fenotipo propio de CMEL funcionales que cuando el aislamiento celular se hace mediante la técnica de explantes. Estos resultados sugieren que en un caso clínico en el que se pueda elegir aislar las células de una forma u otra, y cuando el criterio de elección para determinar un método de aislamiento u otro sea en base al número de CMEL que se quieran trasplantar, la mejor opción es optar por el cultivo de células epiteliales limbares a partir de suspensiones celulares.

En conjunto, el trabajo realizado a lo largo de estos años, y que ha dado lugar a esta tesis doctoral, ha demostrado que es posible mejorar las técnicas de cultivo *in vitro* de las CMEL para su posterior trasplante al ser humano. Esto hace posible que nuestros resultados puedan ser transferibles a la práctica clínica habitual y mejorar así la calidad de los trasplantes realizados con la finalidad última de reconstruir de forma más eficaz la superficie ocular afectada por el SIL.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado protocolo que permite obtener varios CPLs, similares entre sí y con una población celular rica en CMEL, a partir de un único explante limbar. Dicho proceso puede ser aplicado en investigación para salvar el factor limitante de muchos estudios, el número de donaciones de tejidos limbares. Además, utilizando un soporte celular, este protocolo podría ser transferido a las salas de producción celular, donde se generan los CPLs para los pacientes afectados por SIL. De esta forma, se podría generar un reservorio de cultivos primarios limbares para cada paciente trasplantado, pudiendo ser utilizados si se produjese algún fallo en cualquiera de los pasos del trasplante inicial. Si finalmente los cultivos creados como reservorio celular no fuesen requeridos para su trasplante al paciente, podrían ser caracterizados *in vitro* y correlacionar los hallazgos obtenidos *in vitro* con los datos clínicos.
2. Se ha diseñado un medio de cultivo libre de compuestos de origen animal y de componentes potencialmente nocivos que permite cultivar CPLs con un porcentaje aceptable de CMEL. Dicho medio de cultivo, denominado IOBA-SH bioseguro, podría ser transferido a las salas de producción celular para expandir biopsias limbares de tal forma que se originen cultivos primarios bioseguros, dando lugar a trasplantes en los que exista una probabilidad nula de originar zoonosis o efectos secundarios en los pacientes trasplantados.
3. Ha sido posible demostrar, que utilizando un medio de cultivo libre de componentes animales y de compuestos potencialmente nocivos, los CPLs establecidos a partir de suspensiones celulares presentan una población celular más rica en CMEL funcionales que cuando dichos cultivos son establecidos a partir de explantes limbares. Estos resultados pueden extrapolarse a la clínica, sugiriendo que en un caso clínico en el que se puede elegir aislar las células de una forma u otra del nicho limbar, ya sea de un donante vivo o cadáver, y cuando el criterio de elección para determinar un método de aislamiento u otro sea en base al número de CMEL que se quieran trasplantar, la mejor opción es optar por el cultivo de células epiteliales limbares a partir de suspensiones celulares.
4. Se ha demostrado que es posible mejorar las técnicas de cultivo *in vitro* de las CMEL. La transferencia de estos resultados a la práctica clínica habitual podría mejorar la calidad de los trasplantes de CMEL cultivadas *in vitro*, con la finalidad última de reconstruir de forma más eficaz la superficie ocular afectada por el síndrome de insuficiencia límbica.

**LIMITACIONES DEL TRABAJO Y
FUTURAS INVESTIGACIONES**

LIMITACIONES DEL TRABAJO

Las conclusiones obtenidas a partir de este trabajo están limitadas por una serie de factores que se han ido exponiendo a lo largo de la redacción del mismo. A continuación se enumeran dichas limitaciones:

- Los tejidos limbares utilizados procedían de donantes de edad avanzada y transcurrieron varios días desde la enucleación de los mismos hasta su uso en el laboratorio. Ambos factores limitan la calidad de los CPLs obtenidos y sesgan los resultados finales.
- La escasa disponibilidad de tejidos donantes, así como la variabilidad biológica entre ellos limita la extrapolación de los resultados obtenidos en nuestras muestras de estudio a la población total.
- El hecho de que se hayan tratado en los diferentes experimentos de igual forma los explantes limbares procedentes de diferentes regiones del anillo limbar puede estar influyendo a los resultados obtenidos.
- La metodología utilizada en la preparación de las muestras para la inmunofluorescencia de los CPLs cultivados con medio de cultivo no suplementados con FBS puede estar sesgando los resultados obtenidos en la caracterización celular, ya que creemos que parte de las células no fueron analizadas.
- Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de clonogenicidad están limitados por el escaso número de colonias que se subcultivaron.

FUTURAS INVESTIGACIONES

Como futuros pasos a seguir en esta línea de investigación, se ha considerado testar el protocolo establecido para el cultivo consecutivo de una misma biopsia limbar y el medio de cultivo IOBA-SH bioseguro sobre un sustrato celular que permita transferir estos resultados a salas de producción celular, para establecer su posterior uso en el trasplante de CMEL al ser humano. Parte de estos estudios ya están siendo realizados por nuestro grupo de investigación.

ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION ANDJUSTIFICATION

The ocular surface is an anatomical, histological, physiological, and pathological unit composed of the corneal, limbal, and conjunctival epithelia, as well as the underlying connective tissue (stroma) and the overlying tear film.^{31,32} The cornea is the transparent structure of the ocular surface that allows light to be transmitted to the retina and protects other intraocular structures. It establishes a chemical and mechanical barrier between the inner eye and the environment. The corneal surface is covered by a stratified non-keratinized epithelium that is continually renewed and maintained by a population of stem cells that reside in the junction between the cornea and the sclera-conjunctiva, the limbus (reviewed by¹⁸⁵⁻¹⁸⁷) (Figure 1).

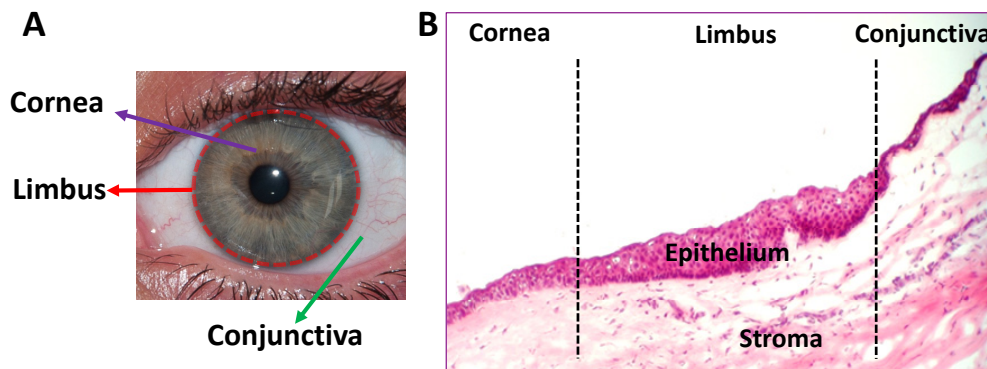


Figure 1. The ocular surface. (A) Macroscopic location of cornea, corneo-scleral limbus, and conjunctiva. (B) Histology of the corneal, limbal and conjunctival epithelium. The corneal epithelium is highly regular with a uniform stratified squamous epithelium of constant thickness, while the limbal epithelium is thicker with a larger number of cell layers. The cells of the limbal basal layer are smaller than limbal upper layer and stem cells reside among them. The conjunctival epithelium is thinner than the limbal one and more loosely arranged. Image courtesy IOBA Pathology Laboratory (hematoxylin and eosin staining, 10X).

Anatomically, the limbal epithelial stem cell (LESC) niche is located at the Palisades of Vogt,⁹⁹ which is highly pigmented because of the presence of melanocytes, and it is infiltrated with antigen-presenting Langerhan's cells and suppressor T-lymphocytes (Figure 2).⁶⁸⁻⁷⁰ The LESCs are specifically localized in the basal layer of the corneoscleral-limbal epithelium, in the limbal niche, and are mainly characterized by their small size,⁴⁵ the absence of differentiation markers such as keratin (K) 3 and K12,^{42,43} slow cell cycle, and high nucleus-to-cytoplasm ratio.⁶⁷

Unlike that of the cornea, the basement membrane of the limbus follows an undulating pattern, with papillae or 'pegs' of stroma extending upward. These anatomic features in the

limbus suggest that LSCs might closely interact with cells in the underlying limbal stroma.^{97,191} This limbal basal membrane is mainly composed of laminin-1, laminin-5, and the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of collagen type IV.⁵¹ Underneath the basement membrane, the limbal stroma is heavily innervated and vascularized (Figure 2).^{98,99} Cells residing in the limbal stroma are heterogeneous. The main cell types are fibroblasts⁹⁰ and melanocytes (reviewed by⁹¹), but mesenchymal cells and cells derived from the bone marrow have been described in the limbal stroma.^{92,94} Recently, more LESC niche structures have been identified, such as the limbal epithelial crypts and focal stromal projections.^{102,103}

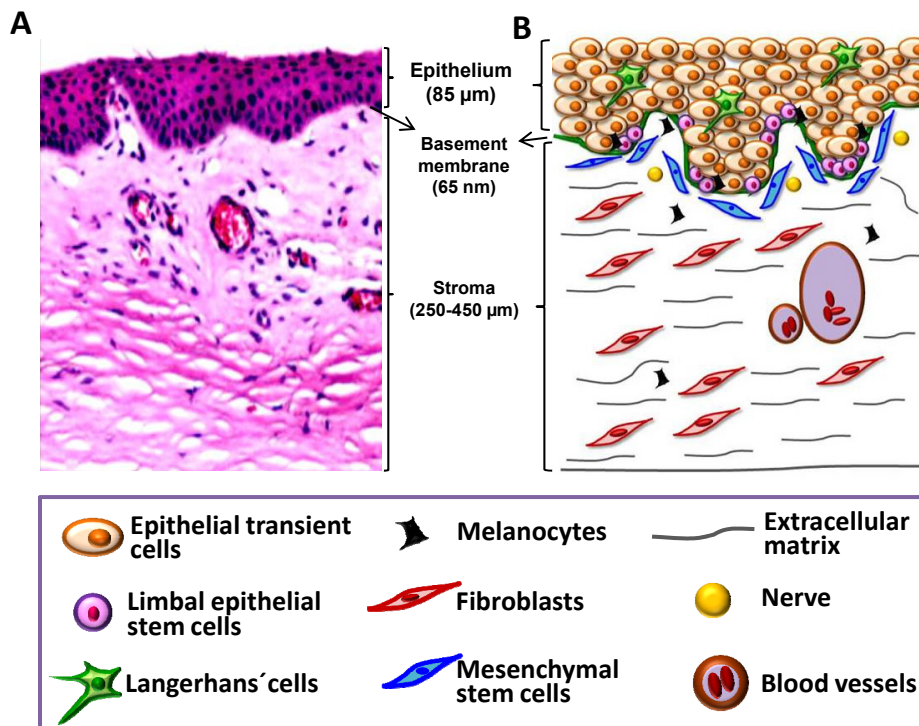


Figure 2. Microscopic structure of the limbal niche. (A) Histology of the limbus showing the thick and undulating epithelium, as well as the underlying vascularized stroma. Image courtesy IOBA Pathology Laboratory (hematoxylin/eosin staining; 10X). (B) Cartoon representing the limbal area.

Limbal stem cell deficiency (LSCD) syndrome is the end-stage morbidity resulting from a critical reduction and/or dysfunction of the LSCs. It is caused by a wide variety of ocular surface disorders such as chemical, thermal or mechanical injuries, multiple eye surgeries, contact lens wear, infections, chronic-severe conjunctivitis, immune-based disorders, severe dry eye syndrome, pterygium, diabetes, etc. This leads to a deficient regeneration of the ocular surface and eventually to persistent epithelial defects, secondary infections, neovascularization, chronic inflammation, ingrowth of conjunctival fibrous tissue (pannus),

and scarring. Any of these can result in a corneal opacity (Figure 3), loss of vision, and a chronic pain syndrome.¹⁰⁵

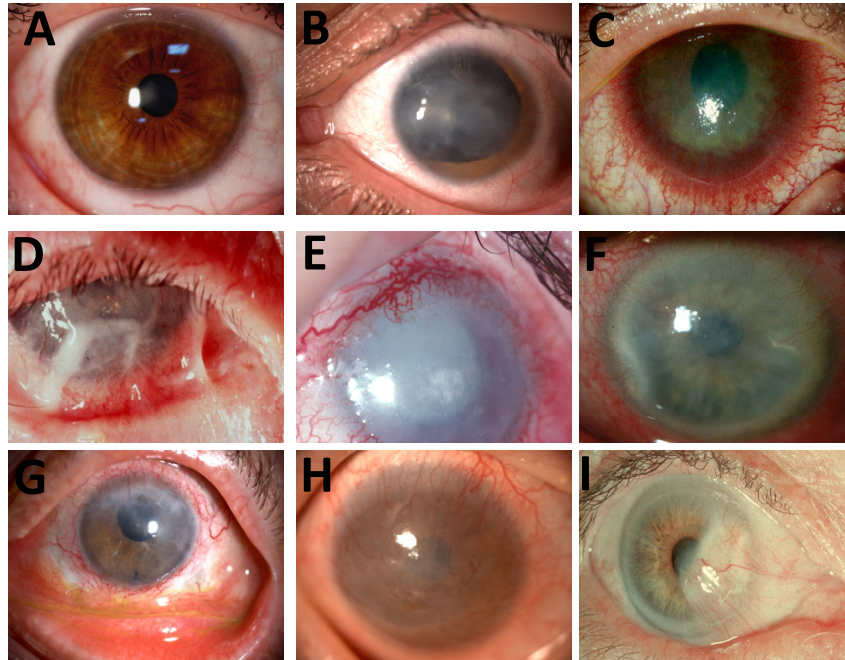


Figure 3. Patients affected by LSCD syndrome. (A) Healthy ocular surface . (B) Ocular surface failure due to limbal stem cell deficiency (LSCD) syndrome from congenital aniridia. (C) Ectodermal dysplasia. (D)Mucous membrane pemphigoid . (E) Chemical injury. (F) Contact lens wear. (G) Infections. (H) Stevens Johnson's syndrome. (I) Pterygium. Images courtesy IOBA Clinical Immunology Unit.

With the increased knowledge of LSCs, the treatment of this pathology has evolved from the simple debridement of the cornea to the use of biological materials.¹¹⁶ Recent advances have included direct transplantation of healthy limbal tissue^{122,123} and the *in vitro* culture of limbal cells for transplantation and re-establishment of a stable corneal epithelial phenotype as first developed by Pellegrini *et al.* (1997).¹²⁸ During the LSCs expansion procedure, LSCs are isolated from healthy limbal tissues and grown on a substratum to produce a limbal primary culture (LPC) that is suitable for transplantation onto the damaged ocular surface (Figure 4).¹²⁴

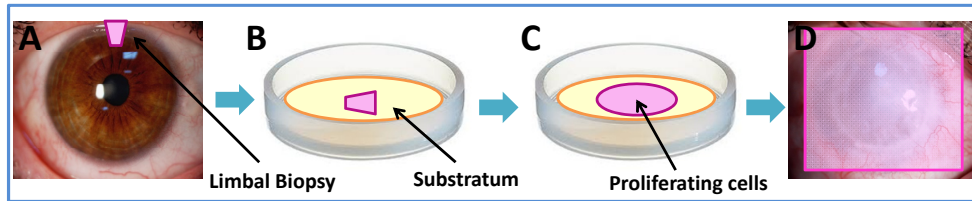


Figure 4. Methodology for *in vitro* expanded limbal epithelial cell transplantation. (A) A limbal biopsy (limbal explant) is removed from the healthy ocular surface. (B) The explant is plated on a culture substratum. (C) The limbal epithelial cells migrate from the explant onto the substratum until a confluent stage is reached. (D) The complex limbal epithelial cell-substratum is transplanted to the damaged ocular surface. Image modified from "Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343:86-93".

The *in vitro* cultured LESC transplantation has been a great advance in the treatment of patients suffering from LSCD, and currently it is the treatment of choice for this pathology. However, this therapy has several limitations, and a standard *in vitro* LESC cultivation protocol has not been established yet. Numerous research groups have reported good and encouraging clinical results using different techniques to culture LESC. ^{124,128,130-134} Therefore, a great deal of research is currently focused on this area, with the purpose to optimize *in vitro* LESC expansion and to further understand LESC biology. ^{135,136,141,195}

Unfortunately, the limited number of ocular tissue donors can often hamper these necessary investigations, and the number of successful LPCs cultured *in vitro* are often not sufficient to ensure a successful transplantation. In addition, *in vitro* expanded LESC transplantation can be hampered by culture failure, graft transport problems, surgical mishaps, or by postoperative complications, which usually occur 1-6 weeks after surgery. ¹³³ Any of these complications could result in early graft failure that entails the necessity of obtaining more tissue, either by biopsy or from a cadaveric donor, which is also limited by the scarcity of donor tissues.

Another important factor that can currently restrict the use of *in vitro* cultured LESC transplantation is the culture media used for cell expansion. Unfortunately these culture media often contain supplements that could induce zoonosis and/or side effects, ^{128,131,133} compromising the potential clinical use of the LPCs obtained.

Examples of culture media components that could be problematic for clinical use include cholera toxin, dimethylsulfoxide (DMSO), and fetal bovine serum (FBS). Cholera toxin is a supplement commonly used in culture medium for *in vitro* LESC culture; however, due to its demonstrated capacity to stimulate keratinocyte proliferation, its use is controversial. ¹⁴⁹ Additionally, it remains theoretically feasible to transmit cholera disease, though the risk is low

given the degree of purification and the low doses added to the culture medium.¹⁴⁶ DMSO, used as a free radical scavenger, is another problematic component often present in culture media for *in vitro* LESC culture. DMSO can induce apoptosis in cultured human corneal epithelial cells. Additionally, it can induce side effects in patients when it is used in different clinical applications.^{151,153} FBS possesses proliferative and anti-differentiation properties¹⁴⁵ that are helpful in establishing LPCs; however, as a component derived from animal origins, it carries the potential to induce zoonosis, such as spongiform encephalopathy.¹⁴⁶

In an effort to improve the biosafety of culture media used for human *in vitro* LESC culture, several research groups have recently reported different culture media compositions in which cholera toxin and DMSO were eliminated, and FBS was replaced by human serum (HS).^{137,140,154,155} However, the removal of cholera toxin and DMSO from culture media can cause a decrease of cell proliferation and compromise the balance of cell oxidative stress, respectively. Recently, Stasi *et al.* reported several culture media in which FBS and other potentially harmful components were replaced by biosafe components.¹⁴¹ They found that these novel culture media allowed the culture of LESC when animal or human fibroblasts were used as supports.

Another important culture condition that has not been well established yet is the technique of isolating the limbal epithelial cells from the limbal niche tissues. Currently, there are two main methods to produce *in vitro* expanded LESC. One is the explant culture technique in which a small limbal biopsy (limbal explant), from 1 to 6 mm², is plated on the substratum. These biopsies include limbal epithelium and stroma, and they are often removed from either the superior or the inferior limbal ring region, due to the large quantity of LESC in these zones (reviewed by¹²⁴).

The second isolation technique is the suspension culture system, in which limbal tissue is treated with enzymes to separate the stroma from the epithelium, and the isolated epithelial cells are then seeded on the substratum. Usually, this method employs two enzymes: dispase, which digests basement membrane collagen and separates epithelial cells from the stroma, and trypsin, which separates clumps of limbal epithelial cells into a suspension of single cells. These enzymatic protocols can be performed on a limbal biopsy or in a complete limbal ring (reviewed by^{124,130}).

Each isolation method has advantages and disadvantages. Most investigators prefer the explant culture technique because limbal explants are easy to prepare, there is no danger of damaging the limbal epithelium through enzymatic treatment, and only a small donor biopsy is necessary (reviewed by^{124,130}). Disadvantages of this technique include the fact that the cells have to migrate from the limbal tissue onto the substratum. This slows the recovery of the

LESCs because they are located in the more basal layers of the limbal epithelium. In addition, non-epithelial cells can migrate to substratum. In contrast, the cell suspension protocol can facilitate cell isolation from deeper limbal epithelial layers and reduce contamination with non-epithelial cells such as fibroblasts, endothelial cells, and dendritic cells. The disadvantages of LES C isolation through cell suspensions are that it is more time-consuming and the enzymatic treatment can affect the integrity of limbal cells.

For these reasons, development of new methodologies is necessary to improve the necessary steps of LES C isolation and culture that occur before the cells can be transplanted onto the ocular surface of patients. The ultimate final aim of these investigations is to improve clinical outcomes in the treatment of LSCD.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

HYPOTHESIS

The current protocols used for *in vitro* limbal epithelial culture can be optimized by increasing the number of LPCs produced by a single biopsy, improving the biosafety of the culture media used throughout the culture procedure, and incrementally improving the quantity of LESC in the LPCs.

OBJECTIVES

1. To increase the number of LPCs available by establishing consecutive LPCs with a cell population rich in LESC from a single limbal biopsy.
2. To obtain LESC-enriched LPCs by using a culture medium lacking animal or any other supplements that are potentially harmful for humans.
3. To determine which isolation technique renders the highest recovery of LPC LESC from the limbal niche.

METHODOLOGY

1. Cell line culture

1.1. Human corneal epithelial cell line

Simian virus-40-transformed human corneal epithelial (HCE) cells (a kind gift from Arto Urtti, University of Helsinki, Finland) were expanded on culture flasks at a density of 10,000 cells/cm².¹⁶⁴ The culture medium contained DMEM/F12-GlutaMAX™ (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 solution) (3.1 g/l glucose, with pyruvate) (1:1) supplemented with 15% FBS, 0.5% DMSO, 0.1 µg/ml cholera toxin, 10 ng/ml epithelial growth factor (EGF), 5 µg/ml human insulin, and antibiotics (62.5 U/ml penicillin, 62.5 mg/ml streptomycin). Cells were incubated at 37°C, under 5% CO₂ and 95% humidified air until they reached 90% confluence. The culture medium was carefully changed every 2–3 days.

1.2. Colorectal adenocarcinoma cell line (HT29-MTX)

A colorectal adenocarcinoma cell line, a kind gift from Dr. Thècla Lesuffleur (INSERM U843, Paris, France) was expanded.^{165,166} HT29-MTX cells were cultivated in DMEM (25 mM glucose) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C, under 5% CO₂ and 95% humidified air until they reached 90% confluence. The culture medium was carefully changed every 2–3 days.

1.3. Mouse embryonic 3T3 fibroblast cell line (3T3/J2)

A mouse embryonic 3T3/J2 fibroblast cell line was acquired from ATCC (CCL-92), and it was cultured as recommended by Daniels *et al.*¹⁶⁷ This cell line was established by G. Todaro and H. Green in 1962 from embryonic mouse cell suspensions.¹⁶⁸ The cells were cultured with DMEM-GlutaMAX™ (4.5 g/l glucose, without pyruvate) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 0.25 µg/ml of amphotericin (antibiotics-antifungal solution), and 10% FBS. The cells were incubated at 37°C, under 5% CO₂ and 95% humidified air until 80% confluence was reached. The culture medium was carefully changed every 2–3 days.

2. Human tissue preparation

This protocol was approved by the IOBA Research Committee and the Valladolid Medical School Ethics Committee. The Tenets of Declaration of Helsinki were followed at all times. Cadaveric non-diseased human corneoscleral tissues were obtained from the Barraquer Eye Bank (Barcelona, Spain) and preserved in supplemented culture medium at 4°C. All corneoscleral tissues were rinsed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 50

µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B. Subsequently, corneoscleral tissues for immunofluorescence microscopy were fixed in 4% formaldehyde, embedded in Tissue Tek OCT compound and stored at -80°C.

Human skin and tonsil tissues were obtained from a certified Tissue Bank (León, Spain). Skin, tonsil and corneoscleral tissues for immunofluorescence microscopy were fixed in 4% formaldehyde, embedded in Tissue-Tek-OCT-compound, and stored at -80°C. Cryosections of 5 µm were performed from frozen human tissues.

3. Primary cultures

3.1. Limbal epithelial primary cultures

Corneoscleral tissues were rinsed with HBSS containing 50 µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B. Excess sclera, conjunctiva, iris, and corneal endothelium were removed, and a central corneal button was extracted with a 7.5 mm trephine and discarded. The remaining ring of tissue contained the limbus. Limbal epithelial cells were isolated from the limbal niche through two different techniques (described below) and were incubated with different culture media.

3.1.1. Limbal epithelial cell isolation techniques

3.1.1.1. Limbal explants

The remaining corneoscleral rings were cut into 1-4 mm² limbal explants that were plated singly into 3.8 cm² polystyrene wells. After 30 min in a laminar flow hood, each explant was incubated with 50 µl of FBS, human serum (HS), or CnT20 (depending on the culture medium in which the LPCs were to be incubated) overnight at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. After that, each limbal explant was maintained in culture until migrating cells from all limbal explant edges originated a cell ring around it. Then, it was removed and the remaining LPC was allowed to reach confluence, whereupon it was designated LPC0. When the limbal explants were removed, some of them were then plated again in a new culture dish, and a similar procedure was followed to obtain the LPC1. This protocol was repeated as many times as possible to obtain LPC2, LPC3, etc.

3.1.1.2. Cell suspensions

Each limbal rim was divided into two similar portions. Each portion was incubated with 1.2 U/ml of dispase II at 37°C for 2 h. The epithelial sheets were then mechanically removed, collected and treated with 0.25% trypsin-1mM EDTA at 37°C for 10 min to isolate single cells. The isolated limbal epithelial single cell suspension was centrifuged, re-suspended, and then

seeded at a density of 1.5×10^3 cells/cm² into 3.8 cm² polystyrene wells. Cultures were incubated at 37°C under 5% CO₂ and 95% humidity, and the medium was changed every 2–3 days until 90% confluence was reached.

3.1.2. Culture media

3.1.2.1. CnT20

CnT20 is a commercial serum-free culture medium used for limbal epithelial cell expansion. The exact composition of this culture medium is unknown, (<http://www.cellIntec.com/products/corneal/culture-media/cnt-20>).

3.1.2.2. Culture media modifications

For these experiments, we developed four different culture media by modifying the base medium composed of DMEM/F12 (Table 1).

Table 1. Composition of the four new culture media modified for *in vitro* limbal epithelial cell expansion.

Compounds	IOBA-cholera toxin	IOBA-FBS	IOBA-HS	IOBA-HS biosafe
Gentamicin	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Amphotericin-B	2.5 µg/ml	2.5 µg/ml	2.5 µg/ml	2.5 µg/ml
Insulin	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
Transferrin	5.5 µg/ml	5.5 µg/ml	5.5 µg/ml	-
Sodium-Selenite	5 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml	-
Hydrocortisone	0.01 µg/ml	0.5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.4 µg/ml
EGF	2.5 ng/ml	2.5 ng/ml	2.5 ng/ml	5 ng/ml
Cholera toxin	132.5 ng/ml	-	-	-
Isoproterenol	-	1 µM	1 µM	1 µM
Adenine	-	0.18 mM	0.18 mM	0.18 mM
Triiodothyronine	-	2 nM	2 nM	2 nM
DMSO	0.5%	-	-	-
FBS	5%	10%	-	-
HS	-	-	10%	10%

FBS; fetal bovine serum, HS; human serum, EGF; epidermal growth factor, DMSO; dimethyl sulfoxide. DMEM/F12 (1:1) solution was supplemented with the compounds shown in the table. Insulin, transferrin, and selenite were added as a commercial ITS solution to IOBA-cholera toxin, IOBA-FBS, and IOBA-HS culture media.

3.2. Limbal fibroblast primary cultures

The limbal epithelium was separated from the stroma by incubation with 5 mg/ml dispase II (as described above). Then the limbal stroma was chopped and the portions were digested with 2 mg/ml collagenase I overnight at 37°C. The collagenase was inactivated with FBS, and the cell suspension was centrifuged. The supernatants were discarded, and the resulting cell pellets were cultured and expanded at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity for three passages.. The incubation medium was composed of low-glucose (1 g/l), DMEM, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 1% non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

4. Analysis of limbal epithelial primary cultures

LPCs were monitored under a phase contrast microscope (Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japan). The percentage of successful LPCs was calculated based on the number of LPCs started from explants or from cell suspensions. The elapsed time from limbal explant or cell suspension plating to LPC confluence (LPC generation time) was determined. For LPCs established from limbal explants, the elapsed time from explant plating to removal was also determined.

To calculate the number of cells in each confluent LPC, the cells were trypsinized and the total live and dead cells were counted by the Trypan Blue-Neubauer chamber method. Cell viability was calculated as:

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{Number of live cells}}{\text{Total number of cells}} \times 100$$

5. Cell morphology under phase contrast microscopy

Cell size and morphology were analyzed by phase contrast microscopy (Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japan). Micrographs of the LPC cells were taken from one randomly selected area, and the high and low diameters were measured in five selected cells. Three LPCs from different donors were analyzed for each condition (n=3).

6. Cell morphology by transmission electron microscopy

Limbal epithelial cell ultrastructure was examined by transmission electron microscopy. The LPCs were grown on Thermanox® coverslips in the same way as when they had been grown

on plastic. When confluence was reached, the LPCs were gently washed twice with PBS and then fixed with Karnovsky's fixative at 4°C. The samples remained in these conditions until they were washed and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h at 4°C. They were then dehydrated in ascending grades of ethanol and embedded in epoxy resin. Thin sections (50 nm) were cut with a glass knife (parallel and perpendicular cuts) and mounted onto grids. They were counterstained with uranyl acetate and/or lead citrate. The samples were viewed under a transmission electron microscope JEOL 1010 (Peabody, MA, USA) operating at 80 Kv (images acquired with a SC1000 Orius CCD camera, Gatan, UK) or JEOL JEM-1011 HR (Peabody, MA, USA) working at 60-100 Kv (images taken with a ES1000W CCD camera, Gatan, UK).

7. Histology study

Limbal explants from fresh cadaveric limbal rings and limbal explants cultivated for 6 consecutive passages were fixed in 4% formaldehyde, treated with sucrose (5% and 30%), embedded in Tissue-Tek-OCT compound and stored at -80°C. Cryosections (5 µm) were stained with periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin in the standard manner to examine overall morphology. Three LEs from three different donors (n=3) were analyzed for each condition.

8. Immunofluorescence microscopy study

8.1. Samples from human tissues

Cryosections of 5 µm were cut from frozen human tissues (corneosclera, skin, and tonsil), and fixed with cold methanol for 10 min at -20°C.

8.2. Samples from cultures

Confluent HCE, HT29-MXT, limbal epithelial primary cultures, and limbal fibroblast primary cultures were incubated with 0.25% trypsin-1 mM EDTA for 5 min at 37°C. Subsequently, the cell suspensions obtained were centrifuged. The number of live cells was calculated by the Trypan blue-Neubauer chamber method. Finally, the cells were prepared for immunofluorescence microscopy by two different techniques (described below).

8.2.1. Samples in Permax[®] multichambers

Cell suspensions were seeded into eight-well Permax chamber slides for overnight culture. The cell density was different for each cell type: 12,500-25,000 cell/cm² for HCE and limbal

epithelial cells from primary cultures, 5,000 cells/cm² for limbal fibroblasts, and 150,000 cells/cm² for HT29-MXT cells. Finally, the cells were fixed with cold methanol for 10 min.

8.2.2. Samples prepared by cytopspin

Only cells from confluent LPCs were prepared following this methodology. A total of 40,000-50,000 cells in 250 µl of DMEM-F12 were pelleted by cytocentrifugation with low acceleration. The cells were deposited onto a 28 mm² area of poly-L-lysine-treated glass slides and fixed with cold methanol at -20°C for 10 min.

8.3. Immunofluorescence microscopy protocol

Cryosections of fixed human tissues and fixed cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 10 min and incubated for 1 hour with 5% donkey serum at room temperature. Samples were incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (Table 2) and incubated for 1 hour at room temperature with secondary antibody (Alexa Fluor[®] donkey anti-mouse 1:200 or Alexa Fluor[®] donkey anti-rabbit 1:300). Nuclei were counterstained with propidium iodide (1:12,000). Images were acquired with an inverted fluorescence microscope (DM4000B, Leica, Wetzlar, Germany). Limbal cell images at 20X magnification were made of five randomly selected areas, and the percentage of positive cells was calculated. Negative controls included the omission of primary antibodies.

Table 2. Antibodies used for immunofluorescence assays.

Antibodies	Clone	Dilution	Specificity
Keratin 3 (K13)	AE5	1:50	Corneal epithelial cells
Keratin 12 (K12)	H-60	1:50	Corneal epithelial cells
Keratin 14 (K14)	RCK107	1:50	LESCs
Keratin 15 (K15)	LHK15	1:50	LESCs
ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2)	BXP-21	1:20	Undifferentiated cells
Nuclear factor transcription p63 (objectives 1 and 2)	4A4	1:50	LESCs
Nuclear factor transcription p63α (objective 3)	-	1:50	LESCs
Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)	Ab-1	1:20	Endothelial cells
Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART1)	A103	1:50	Melanocytes
S100 calcium binding protein A4 (S100A4)	1B10	1:50	Fibroblasts
αX integrin (CD11c)	b-ly6	1:100	Dendritic cells
Proliferation marker Ki67	MIB-1	1:50	Proliferative cells

LESCs: Limbal epithelial stem cells.

9. Real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR)

9.1. Tissue and cell mRNA extraction

The epithelium from 6 corneal and 6 limbal specimens were scraped and collected in RNA lysis buffer (1:100 β -mercaptoethanol-buffer RLT RNeasy[®] Mini Kit). Limbal stromal mRNA was isolated from 3 other donors after scrapping off the epithelium and endothelium. The stroma was incubated with 20 μ l RNA lysis buffer/mg tissue, cut, and homogenized. Lysates were collected and centrifuged at 15,000 g for 3 min. Supernatants were purified in Qiashredder columns (RNeasy[®] Mini Kit) following the manufacturer's recommendations.

Confluent LPCs were incubated with RNA lysis buffer. Total mRNA from limbal and corneal epithelium, limbal stroma, and confluent LPCs was extracted by RNeasy[®] Mini Kit, treated with RNase-Free DNase I Set, and quantified using the commercial kit Quant-iT RNA Assay and Qubit-fluorometre (Invitrogen-Gibco, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

9.2. Real time RT-PCR

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of total mRNA by SuperScript[®] VILO[™] cDNA Syntesis Kit using the thermocycler (Mastercycler[®] Personal, Eppendorf AG, Cologne, Germany,). In brief, 2 μ l of cDNA (20 ng) were used for real time RT-PCR in a total volume of 20 μ l containing 1 μ l of 20X Target primers-Taqman[®] probes (Table 3), 10 μ l of 2X Taqman Universal PCR Master Mix, and 7 μ l of water. Real time RT-PCR parameters consisted of uracil N-glycosylase activation at 50°C for 2 min, pre-denaturation at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, and annealing and extension at 60°C for 1 min, in a 7500 Real Time PCR System from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Assays were performed in duplicate. A non-template control was included in all experiments and the human *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* gene was used as the endogenous control. The comparative cycle threshold (Ct) method, where the target fold = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, was used to analyze the results.

Table 3. Oligonucleotide primers and probes used for real time RT-PCR.

Gen name	Gen symbol	Identification number*	Specificity
Keratin 3	<i>KRT3</i>	Hs00365080_m1	Corneal epithelial cells
Keratin 12	<i>KRT12</i>	Hs00165015_m1	Corneal epithelial cells
Keratin 14	<i>KRT14</i>	Hs00559328_m1	LESCs
Keratin 15	<i>KRT15</i>	Hs00267035_m1	LESCs
ATP-binding cassette, sub-family G, member 2	<i>ABCG2</i>	Hs00184979_m1	Undifferentiated cells
Nuclear factor transcription p63 α	<i>TP63</i>	Hs00978338_m1	LESCs
S100 calcium binding protein A4 (S100A4)	<i>S100A4</i>	Hs00243201_m1	Fibroblasts
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	4352934E	All cells

*Identification number from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

10. Clonogenicity assays

10.1. Colony forming efficiency

10.1.1. Maintenance of 3T3/J2 mouse fibroblasts as a feeder layer

For clonogenicity assays, 3T3/J2 mouse fibroblasts were used as a feeder layer. They were maintained in specific culture medium (described above) upon reaching 80% confluence. Then, mitosis was arrested by adding 10 μ g/ml of mitomycin C to the fibroblast culture medium (specified above) for 2 h. Growth-arrested 3T3/J2 fibroblast were plated at seeding densities of 2.7×10^4 cells/cm² on 100-mm dishes.

10.1.2. Limbal epithelial cells co-cultured with 3T3/J2 fibroblasts

Limbal epithelial cells from confluent LPCs were plated on a feeder layer at a seeding density of 20 cells/cm² and were maintained for 10-11 days. Cultures were kept at 37°C, 5% CO₂ and 95% relative humidity with the specific culture medium shown in Table 4.

10.1.3. Colony fixation and counting

Cultures were kept until day 10 or 11. Then, the colonies were washed and fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Subsequently, the cells were rehydrated with PBS and stained with 2% rhodamine B for 3 min at room temperature. Finally, the colonies were counted and the colony forming efficiency (CFE) was calculated using the equation:

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{Number of cells seeded}} \times 100$$

Table 4. Culture medium used for clonogenicity assays. DMEM/F12 + DMEM GlutaMAX™ 4.5 g/l glucose and without pyruvate (1:3) were supplemented with the compounds detailed.

Components	Concentration
Antibiotic-antifungal solution	100X
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
Hydrocortisone	0.4 µg/ml
EGF	10 ng/ml
Cholera toxin	8.5 ng/ml
Sodium bicarbonate	0.075%
Adenine	0.18 mM
Triiodothyronine	2 nM
FBS	10%

EGF, epidermal growth factor; FBS. fetal bovine serum

10.2. Clonal analysis

For clonal analysis, co-cultures of 3T3/J2 fibroblasts with limbal epithelial cells were established following the same protocol as for the CFE study described above. However, for these experiments, the cells were maintained for 8-9 days, instead of 10-11 days, until the colonies diameters were 700–900 μm . After trypsinization of the feeder layer, 10 randomly selected colonies were individually trypsinized using cloning cylinders. Single colonies were then transferred to secondary 100-mm dishes and grown for an additional 13 days. Then, the colonies were washed and fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Subsequently, the cells were rehydrated with PBS and stained with 2% rhodamine B for 3 min at room temperature. Finally, the terminal and non-terminal colonies were counted.

The characterization of terminal and non-terminal colonies is shown in Table 5. Transferred clones that gave rise to <5% aborted colonies were defined as “holoclones”. For transferred clones that formed no colonies or only terminal colonies, the clones were classified as “paraclones”. When more than 5% but less than 100% of the colonies were terminal, the clones were classified as a “meroclones”. Holoclones originate from undifferentiated cells, while meroclones and paraclones are derived from transit amplifying and differentiated cells.⁸⁷

Table 5. Characteristics of terminal and non terminal colonies

	Terminal	Non-terminal
Perimeter	Irregular	Smooth
Morphology	Irregular	Nearly circular
Size	Less than 5 mm ² (Less than 1260 μm diameter)	10-30 mm ² (1780-3000 μm diameter)
Cells	Large and flattened	Small

11. Statistical analysis

The statistical analysis of this work was done under the supervision of the IOBA Statistical Unit (Licensed statistician: Itziar Fernández, PhD). All values were expressed as means \pm standard error of the means (SEM). P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Statistical significance was determined by one or two-way factorial ANOVA, except for the comparison between two groups and for the real time RT-PCR results. The comparison between two groups was made using Student's t-test. For real time RT-PCR result analysis, the calibrator-control group (value 1) was compared with the remaining groups by Student's t-test for one sample. Subsequently, all of the groups were compared in pairs by Student's t-test for independent samples.

RESULTS

Validation of different markers used for cell characterization

Human limbal and corneal tissues were used to validate the expression of specific markers of limbal epithelium (K14, K15, ABCG2, and p63), corneal epithelium (K3 and K12), and limbal fibroblasts (S100A4) by real time RT-PCR and immunofluorescence (Figure 5). The HT29MTX cell line and human skin cryosections were used as positive controls for ABCG2 and p63, respectively.^{11,12} The HCE cell line was used as a negative control for K14 and K15 and as positive controls for K3 and K12 expression. Cultured limbal fibroblasts were used as positive controls for S100A4 expression.¹³

The relative expressions of LESC mRNAs *K14* (72.38 fold), *K15* (62.64 fold), *ABCG2* (630 fold) and *p63 α* (16.64 fold) were significantly higher (*K14* $p \leq 0.0005$ and *K15*, *ABCG2*, *p63 α* $p \leq 0.005$) in limbal epithelium compared to corneal epithelium (Figure 5A). K14 and K15 proteins were detected in the cytoplasm of limbal epithelial cell layers (Figure 5B) and were not detected in the HCE cell line (negative control, Figure 5B). K14 was also expressed in corneal epithelium (Figure 5B). ABCG2 protein was detected in epithelial and stromal limbal cells (Figure 5B) and in the HT29MTX cell line (Figure 5B), but not in corneal epithelial cells (Figure 5B). p63 was only expressed in the nuclei of limbal basal epithelial cells and in human skin (positive control, Figure 5B).

In contrast, the relative expression of *K3* (0.38 fold) and *K12* (0.30 fold) mRNA was significantly lower in limbal than in corneal epithelium ($p \leq 0.005$ and $p \leq 0.0005$, respectively, Figure 6A). In agreement with this, protein expression of K3 and K12, assessed by immunofluorescence, was high in the cytoplasm of all corneal epithelial layers. K12 was also present in the suprabasal layers of limbal tissues (Figure 6B).

The relative expression of *S100A4* mRNA was significantly higher in limbal stroma (330 fold) than in limbal epithelium ($p \leq 0.05$, Figure 6A). S100A4 protein was mainly detected in limbal and corneal stroma (Figure 6B), as well as in human cultured limbal fibroblasts (positive control, Figure 6B).

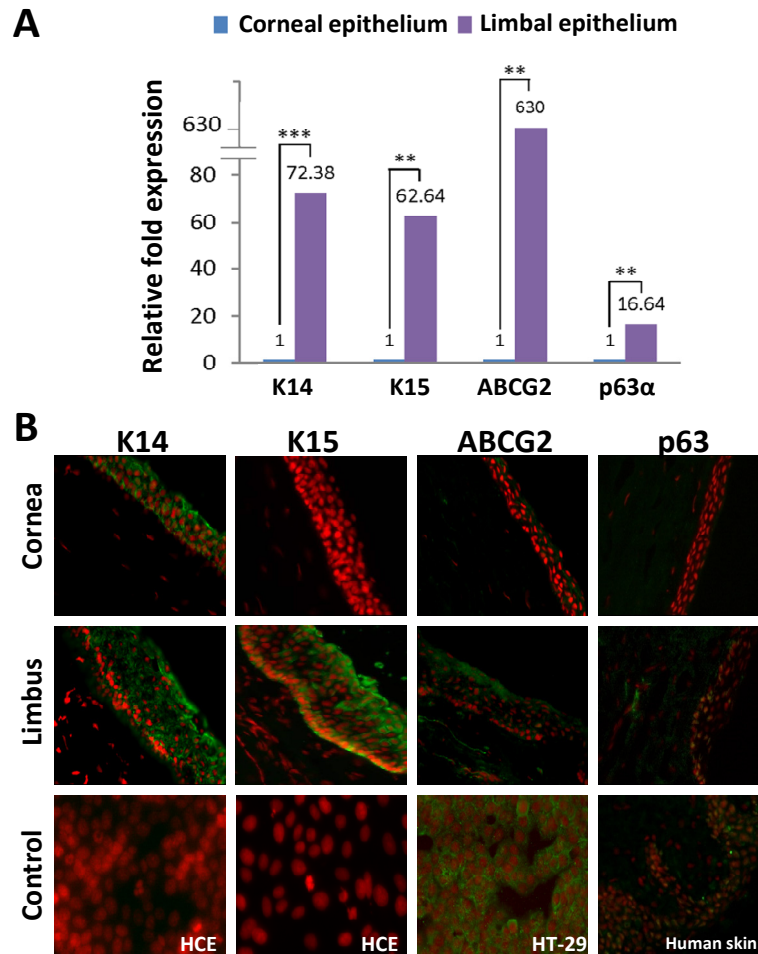


Figure 5. Analysis of LESC marker expression in cadaveric limbal and corneal tissues. (A) Real time RT-PCR showed that relative expression of the LESC specific markers *K14*, *K15*, *ABCG2*, and *p63α* were significantly higher in limbal epithelium than in corneal epithelium. Corneal epithelial mRNA levels for each marker were used as calibrator controls. (B) Representative immunofluorescent staining profiles for K14, K15, ABCG2, and p63 in cryosections of human limbus, human cornea, and different positive and negative control cell lines and tissues. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). LESC markers K15 (green), ABCG2 (green) and p63 (yellow, colocalization of green and red fluorescence) were highly expressed in limbal epithelium. The LESC marker K14 (green) was expressed in both corneal and limbal epithelia. Magnification 40X. Abbreviations: LESC, limbal epithelial stem cells; HCE, human corneal epithelium cell line; HT29MTX, colon adenocarcinoma grade II human cell line; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$.

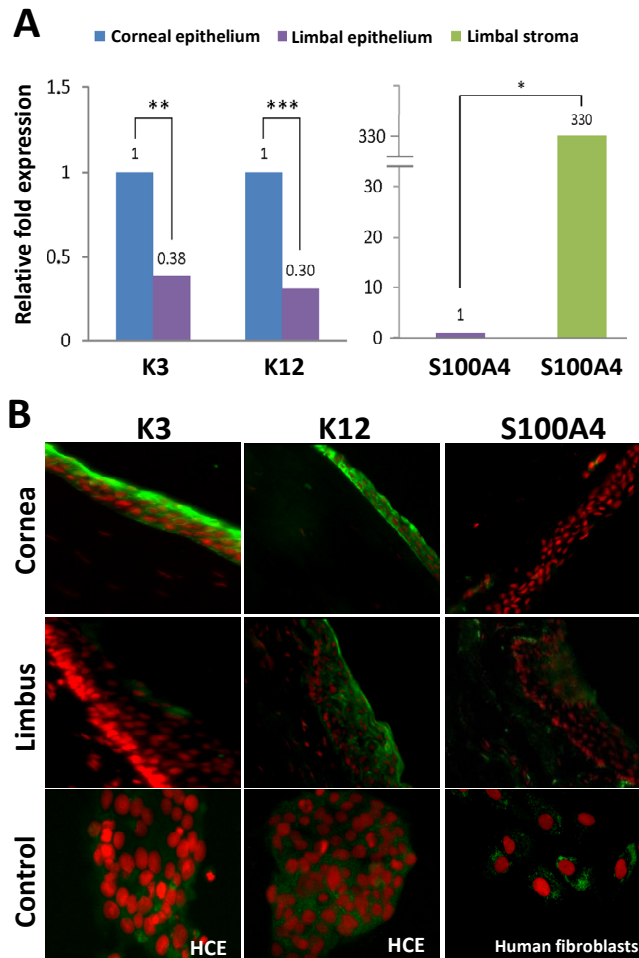


Figure 6. Analysis of specific corneal epithelial cell and fibroblast marker expression in cadaveric limbal and corneal tissues. (A-left) Real time RT-PCR showed that corneal epithelial cell specific markers *K3* and *K12* mRNA were significantly higher in corneal epithelium than in limbal epithelium, and the fibroblast marker *S100A4* mRNA was significantly higher in limbal stroma than in limbal epithelium. Corneal epithelial mRNA levels for each marker were used as calibrator controls. (A-right) Limbal epithelial *S100A4* mRNA served as a calibrator control. (B) Representative immunofluorescent staining profiles for *K3*, *K12*, and *S100A4* in cryosections of human limbus, human cornea, and different positive and negative control cell lines and tissues. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Corneal epithelial cell markers *K3* and *K12* (green) were highly expressed in corneal epithelium. *S100A4* (green) was expressed in corneal and limbal stroma. Magnification 40X. Abbreviations: HCE, human corneal epithelium cell line; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$.

The specificity of antibodies for endothelial cells (PECAM), melanocytes (MART-1), and dendritic cells (CD11c) markers were analyzed by immunofluorescence microscopy. First, the specificity of antibodies was analyzed in positive controls. PECAM protein was detected in endothelial cells of blood vessels in human tonsil, MART-1 protein was expressed by several cells (melanocytes) in human skin epithelium, and CD11c protein was expressed by dendritic cells in the stromal region of human skin tissue (Figure 7). Besides, the expression of these protein markers was analyzed in healthy human ocular surface tissues. Protein expression of PECAM was detected in limbal stroma, while MART-1 and CD11c protein expression was shown in limbal epithelium, specifically in the basal and intermediate layers, respectively (Figure 7). These proteins were not detected in corneal tissues, as expected.

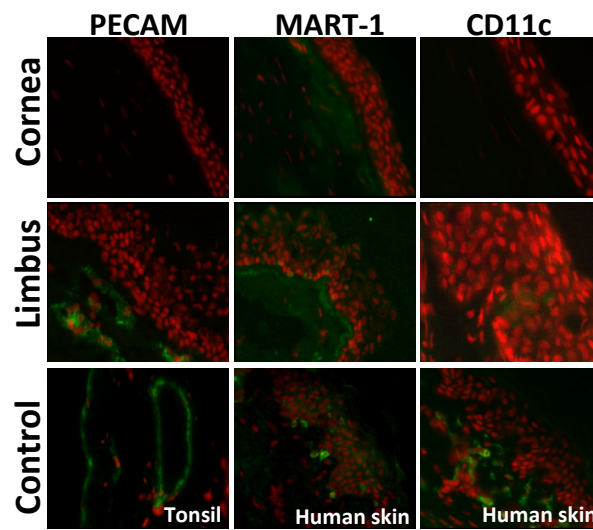


Figure 7. Analysis of non-specific epithelial cell marker expression in cadaveric limbal and corneal tissues. PECAM, MART-1, and CD11c marker expression was not detected in corneal tissue. However, protein expression (green) of PECAM was detected in the limbal stroma, while that of MART-1 and CD11c were detected in the intermediate and basal limbal epithelial layers, respectively. Anti-PECAM, anti-MART-1, and anti-CD11c antibodies successfully detected the specific proteins in positive control samples. Representative immunofluorescence microscopy images (magnification 40X, nuclei in red).

OBJECTIVE 1

The first objective was to increase the number of LPCs available by establishing consecutive LPCs with a cell population rich in LESC from a single limbal biopsy. The IOBA-cholera toxin (Table 1) culture medium was used to develop this objective.

The mean limbal tissue donor age was 81.7 ± 1.5 years (range, 68-87 years). Only tissues that could be cultured within 5 days after death were used. The mean elapsed time was 3.2 ± 0.3 days in the preserved conditions.

1.1. Consecutive LPC characteristics

Confluent LPCs were successfully produced from LPC0 to LPC6. The percentage of confluent LPCs tended to increase from LPC0, $32.5 \pm 7.5\%$, to LPC4, where the highest percentage of confluent LPCs was achieved, $63.7 \pm 12.4\%$. There were no differences in the percentage of successful cultures among the consecutive LPCs 0 through 6 (Figure 8A), and the overall success rate was $49.8 \pm 4.5\%$. The total number of limbal explants plated and confluent LPCs obtained is shown in Table 6. The elapsed time from limbal explants plating to limbal explant removal and elapsed time from limbal explant removal to LPC confluence varied in each consecutive LPC. LPC generation time increased from 26.0 ± 2.8 days in LPC0 to 35.5 ± 7.1 days in LPC6; however, there were no significant differences in generation time, and the average was 29.9 ± 1.7 days to reach confluence (Figure 8B).

Table 6. Number of limbal explants plated and successful (confluent) limbal primary cultures (LPCs) obtained in the different consecutive limbal explant passages.

	LPC0	LPC1	LPC2	LPC3	LPC4	LPC5	LPC6
Number of total donors	13	11	11	10	8	7	6
Limbal explants plated	190	66	48	26	19	16	13
Confluent LPCs	52	31	18	15	11	8	7

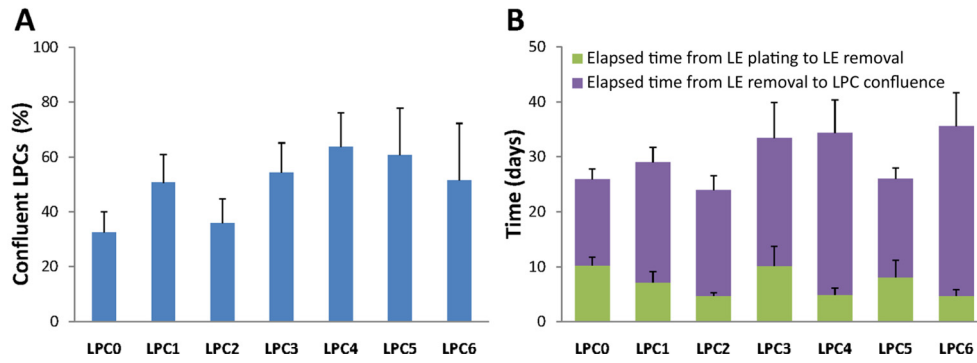


Figure 8. Limbal cell outgrowth from LEs and confluent LPCs during successive passages. (A) There were no significant differences in the percentage of successful LPCs from successive cultures of the LEs. The percentages were calculated considering the variability among donors. (B) The interval between LE plating and removal (green) was similar for all consecutive LE passages. Likewise, there were no significant differences in the elapsed time from LE removal and LPC confluence (purple) for the consecutive LE passages. The times were calculated considering the variability among donors. Abbreviations: LE, limbal explant; LPCs, limbal primary cultures.

By phase contrast microscopy, the cells of LPC0-LPC3 had a homogeneous cuboidal morphology, about $27 \times 40 \mu\text{m}$ (Figure 9A and B). In LPC4, the morphology of the cells became more elongated (Figure 9A), a change that became more apparent as confluence was reached (Figure 9B). Occasionally, this change was observed in LPC3. In LPC5 and LPC6, the cells always had a homogeneous, elongated morphology of about $18 \times 200 \mu\text{m}$ (Figure 9A and B).

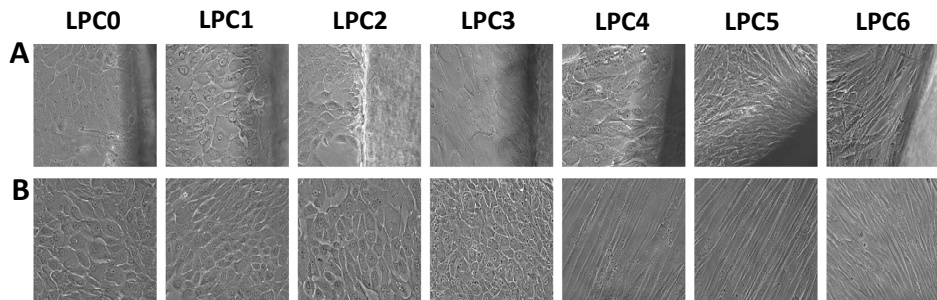


Figure 9. Limbal cell outgrowth from limbal explants. (A) Representative images of limbal cell outgrowth from limbal explants and from (B) confluent LPCs. The cuboidal shape in LPC0-LPC3 evolved to a more elongated morphology in LPC4, LPC5, and LPC6. Magnification 20X. Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures.

1.2. Consecutive LPC characterization

1.2.1. LESC marker expression in LPCs

LESC markers *K14*, *K15*, *ABCG2*, and *p63α* were evaluated for each consecutive LPC (Figures 10 and 11). The mRNA expression level of each LPC was compared to that in LPC0, which was assigned a value of 1. The relative expression of *K14* mRNA increased from LPC0 to LPC2 (4 fold), but the changes were not statistically significant. For LPC3, *K14* expression decreased 7×10^{-5} fold ($p \leq 0.01$, Figure 10A), and it remained low through LPC6. The *K14* relative mRNA expression was significantly higher in LPC0-LPC2 than in LPC3-LPC6 ($p \leq 0.05$, Figure 10A). The percentage of *K14*-positive cells decreased from LPC0, $59.3 \pm 17.1\%$, to LPC4, $9.1 \pm 5.5\%$ (Figures 10E and 11A). *K14* was not detected in any of the cells in LPC5 and LPC6. The percentage of positive cells for *K14* was significantly higher in LPC0-LPC2 than in LPC4-LPC6 ($p \leq 0.01$, Figures 10E and 11A).

The relative expression of *K15* mRNA in LPC1 and LPC2 compared to LPC0 were 0.66 and 1.15 fold respectively. In LPC3, relative *K15* expression was only 0.008 fold, and it remained reduced through LPC6 (Figure 10B). The percentage of *K15*-positive cells in LPC0 was $24.1 \pm 23.8\%$ (Figures 10F and 11B). Similar percentages were present in LPC1 and LPC3, but none was detected in LPC4-LPC6.

The relative expression of *p63α* mRNA increased from LPC0 through LPC2 (2.25 fold), but the changes were not statistically significant (Figure 10C). In LPC3 it decreased 0.003 fold ($p \leq 0.01$) and remained low through LPC6. The percentage of cells expressing *p63* protein in LPC0, $34.2 \pm 16.8\%$, decreased to $3.8 \pm 3.8\%$ in LPC2 ($p \leq 0.01$, Figures 10G and 11C). *p63* was not detectable in LPC3 through LPC6.

The relative expression of *ABCG2* mRNA was lowest in LPC0 (Figure 10D). It tended to increase in LPC1, LPC2 and LPC3, but decreased in LPC4. For LPC4-LPC6, it tended to increase again; however, none of these changes were statistically significant. The percentage of positive cells for *ABCG2* was greater in all LPCs than in LPC0 ($43 \pm 10.4\%$), except in LPC3 where only $6.8 \pm 6.8\%$ of cells expressed it (Figures 10H and 11D).

Table 7. Number of limbal primary cultures (LPCs) from different limbal explants and donors analyzed by real time RT-PCR and immunofluorescence microscopy

LPCs	Real time RT-PCR		Immunofluorescence	
	Explants (n)	Donors (n)	Explants (n)	Donors (n)
LPC0-LPC3	6	3	4	3
LPC4	4	3	4	3
LPC5	4	3	3*	3*
LPC6	3	2	3*	3*

*K12 and ABCG2 markers were not analyzed in LPC5 and LPC6 because the number of samples collected was not enough to perform the assays.

In summary, all mRNA and protein LESC markers analyzed were present in LPC0-LPC2. For these passages, there were no significant differences except for a decrease in p63 and an increase in ABCG2 protein expression. Changes in LESC marker expression was often detected in LPC3 or LPC4. In LPC5 and LPC6, LESC marker mRNAs were detected; however, we did not find protein expression by immunofluorescence.

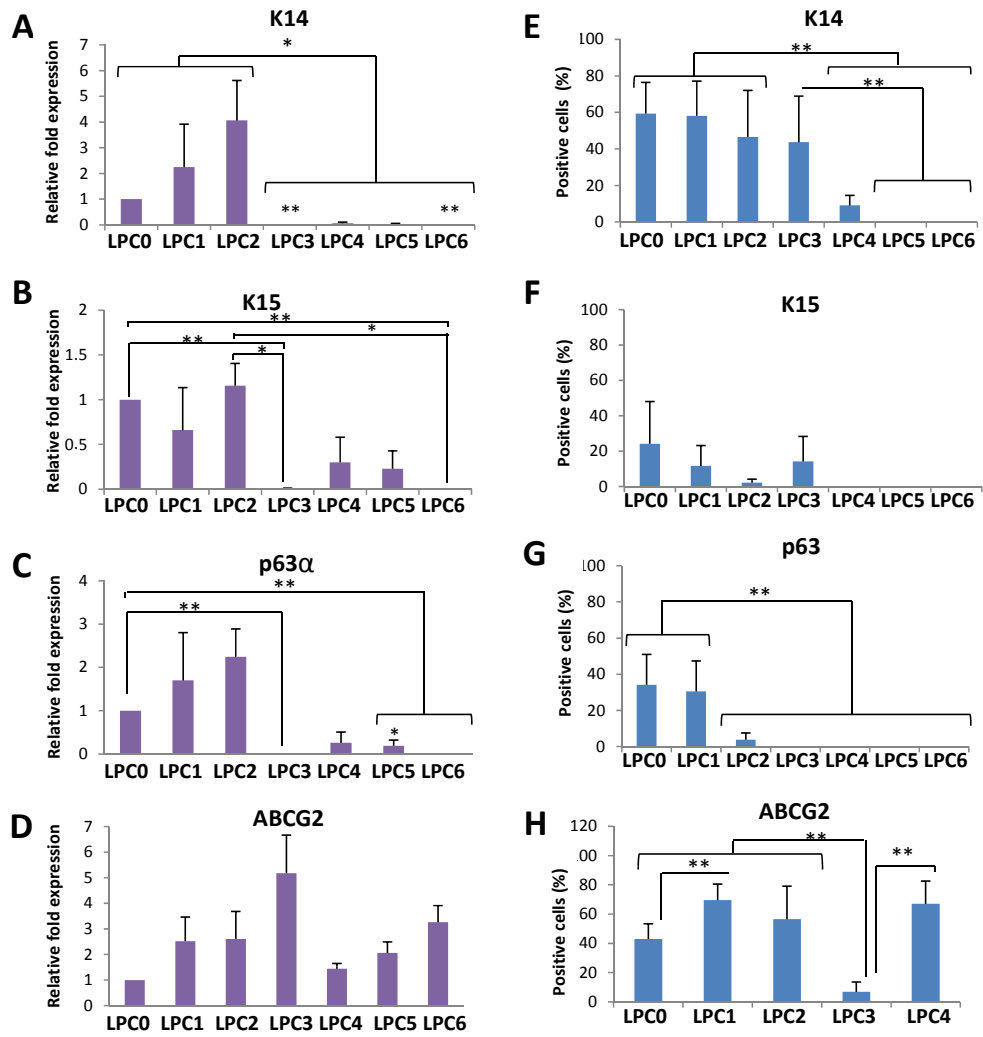


Figure 10. LESC marker expression in consecutive LPCs. Real time RT-PCR profiles showed that the relative expressions of (A) *K14*, (B) *K15* and (C) *p63α* mRNAs was higher from LPC0, the calibrator control, through LPC2 than in LPC3 and subsequent passages. There were no significant differences in the relative expression of (D) *ABCG2* mRNA among consecutive LPCs. For immunofluorescent microscopy staining, the percentage of cells positive for (E) *K14*, (F) *K15*, (G) *p63* and (H) *ABCG2*. There was a decreasing trend in the percentage of positive cells for LESC markers in the consecutive LPCs, except for *ABCG2*. *K14*, *K15*, and *p63α* were not expressed in LPC5 and LPC6. *ABCG2* protein expression was not analyzed in LPC5 and LPC6 because the number of samples collected was not sufficient. Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

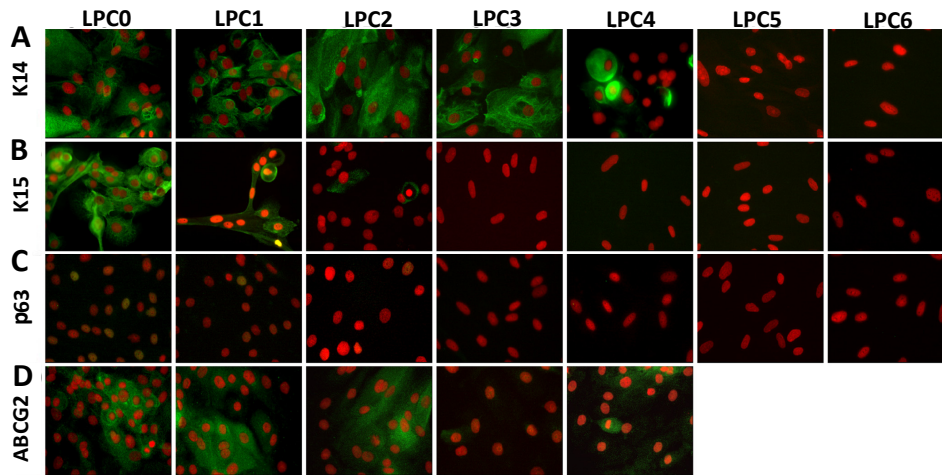


Figure 11. LESC marker expression in consecutive LPCs. There was a decreasing trend in the percentage of positive cells for LESC markers in the consecutive LPCs, except for ABCG2. K14, K15, and p63 were not expressed in LPC5 and LPC6. ABCG2 protein expression was not analyzed in LPC5 and LPC6 because the number of samples collected was not sufficient. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Representative images (40X) for protein expression (A) K14, (B) K15, (C) p63, and (D) ABCG2 in different LPCs. ABCG2, K14, and K15 protein expression are shown in green, while p63 is shown in yellow (red and green fluorescence co-localization). Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures.

1.2.2. Corneal epithelial cell marker expression in LPCs

Corneal epithelial cell markers K3 and K12 were evaluated for each consecutive LPC (Figure 12). The mRNA expression level of each LPC was compared to that in LPC0, which was assigned a value of 1 (Figure 12A and B). The relative expression of K3 mRNA was lower in LPC1 and LPC2 (0.33 and 0.83 fold respectively), though the differences were not significant. However, it decreased significantly ($p \leq 0.05$) in LPC3 (0.03 fold) and remained lower through LPC6 (0.015 fold, Figure 12A). The percentage of K3-positive cells detected by immunofluorescence-microscopy was similar in all LPCs, with an average of $59.2 \pm 5.2\%$ (Figures 12C and 13A). The relative expression of K12 mRNA was similar in LPC1 and LPC2, 5 fold more than in LPC0; however these increases were not statistically significant (Figure 12B). Relative expression decreased dramatically in LPC3 (7×10^{-4} fold, $p \leq 0.01$) and remained lower through LPC6 (6×10^{-4} fold). While the percentage of K12-positive cells increased in LPC1 and LPC2 (approximately $40.5 \pm 0.7\%$ each), the differences compared to LPC0 ($28.3 \pm 4.4\%$) were not significant (Figures 12D and 13B). For LPC3, only $5.9 \pm 3.5\%$ were positive ($p \leq 0.01$), but for LPC4 $74.6 \pm 10.5\%$ were positive ($p \leq 0.01$).

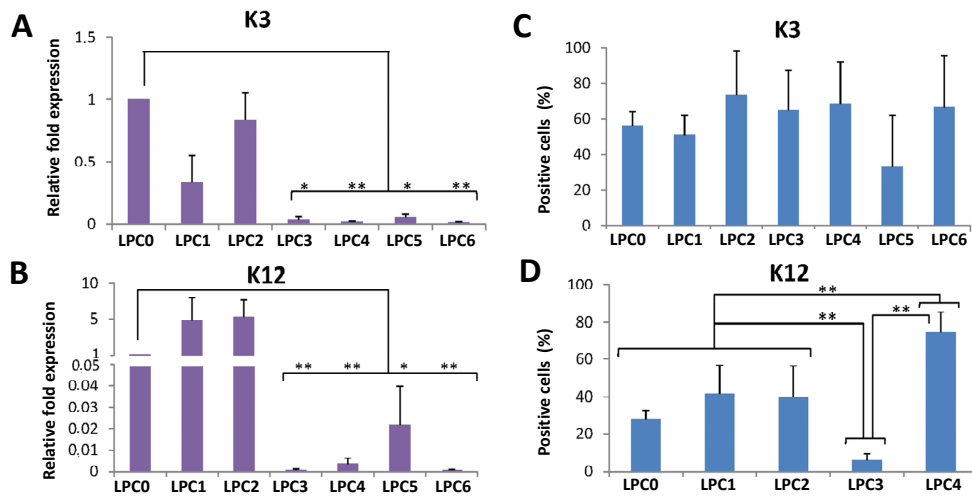


Figure 12. Corneal epithelial cell marker expression in consecutive LPCs. Real time RT-PCR showed that the relative expression of (A) *K3* and (B) *K12* mRNAs was significantly higher in LPC0, the calibrator control, than in LPC3 through LPC6. There were no significant differences in percentage of positive cells for (C) *K3*, while the percentage of positive cells for (D) *K12* was significantly lower in LPC3 and higher in LPC4 than in LPC0-LPC2. Expression of *K12* protein was not analyzed in LPC5 and LPC6 because the collected samples were not sufficient. Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

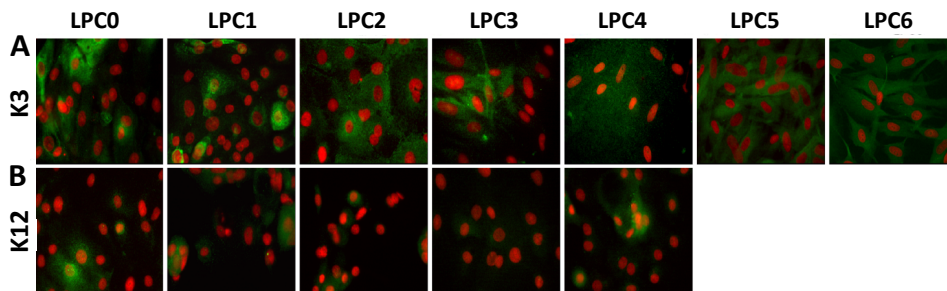


Figure 13. Corneal epithelial marker expression in consecutive LPCs. There were no differences in percentage of positive cells for (A) *K3*, while the percentage of positive cells for (B) *K12* was lower in LPC3 and higher in LPC4 than in LPC0-LPC2. Expression of *K12* protein was not analyzed in LPC5 and LPC6 because the collected samples were not sufficient. Representative images (40X) to (A) *K3* and (B) *K12* in different LPCs (green). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures.

1.2.3. Fibroblast marker expression in LPCs

The fibroblast marker S100A4 mRNA and protein were present in all of the LPCs (Figure 14). The relative expression of *S100A4* mRNA decreased from LPC0 to LPC1 ($p \leq 0.05$). Expression in LPC3 was also significantly lower than LPC0. Other changes were not statistically significant (Figure 14A). The percentage of S100A4-positive cells was significantly higher in all LPCs compared to LPC0 ($p \leq 0.01$). The maximum percentage was $96 \pm 0.7\%$ in LPC6 (Figure 14B and C).

1.3. Histological study of limbal explants

PAS-hematoxylin staining showed that the surface of limbal explants before cultivation was covered by a stratified epithelium of five to six layers in the limbal region (Figure 15A). In contrast, the surface of limbal explants after six consecutive expansions did not show epithelium (Figure 15B). The quantity of stromal cells tended to decrease after six limbal explant passages (Figure 15B).

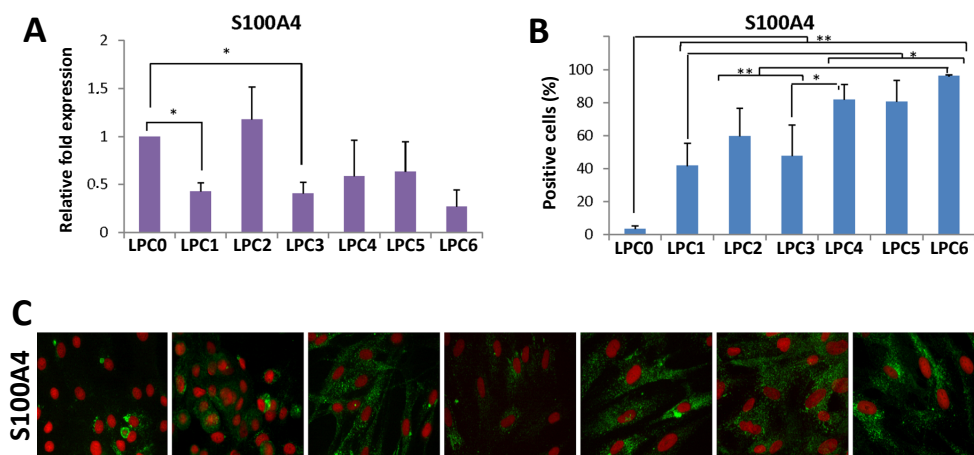


Figure 14. Fibroblast marker expression in consecutive LPCs. (A) Real time RT-PCR profiles showed that the relative expression of S100A4 mRNA was significantly higher in LPC0, the calibrator control, than in LPC1 and LPC3. (B) For immunofluorescent microscopy staining, the percentage of positive cells for S100A4 increased from LPC0 to LPC6. (C) Representative images (40X) S100A4 in different LPCs (green). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Abbreviations: LPCs, limbal primary cultures; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

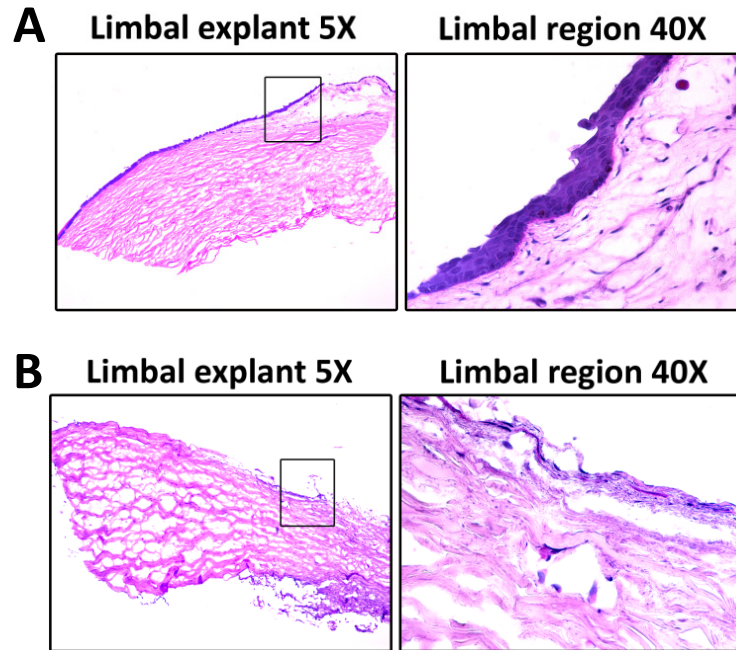


Figure 15. Representative images of PAS-hematoxylin staining for three limbal explants (A) before cultivation and for three different limbal explants (B) after six consecutive passages. The surface of limbal explants before cultivation was covered by a stratified epithelium, however limbal explants after six consecutive expansions did not show epithelium. Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

► In summary, LPCs from LPC0 to LPC2 presented a heterogeneous cell population, with cells positive for LESC markers K14, K15, ABCG2, and p63, differentiated corneal epithelial cell-specific markers K3 and K12, and for the fibroblast marker S100A4. These cells had an epithelial-like morphology. In LPC3-LPC4, elongated cell morphology appeared, and the presence of LESC markers decreased, while the percentage of positive cells for differentiated corneal epithelial cell and fibroblast proteins increased.

OBJECTIVE 2

The second objective was to obtain LESC-enriched LPCs with a culture medium lacking animal and any other potentially harmful supplements for humans. The limbal tissue used for this objective came from cadaveric donors who were 80.8 ± 2.4 year old (range, 60-97 years). Samples were maintained in preserved conditions for 3.0 ± 0.3 days.

2.1. Description of a new modified culture medium, devoid of animal and any other potentially harmful supplements, for human use

To analyze and compare the culture media used by different authors, we performed an exhaustive literature search. DMEM/F12 supplemented with antibiotics, antifungal agents, EGF, insulin, transferrin, selenite, hydrocortisone, cholera toxin, DMSO, and blood serum have been reported to be optimal culture media for *in vitro* limbal epithelial cell expansion. However, several of the supplements can induce zoonosis and/or side effects that can question the biosafety of the LPCs obtained, compromising their clinical application. Here, we report a modified culture medium in which cholera toxin, DMSO, and FBS were all replaced by biosafe components with similar effects. This new culture medium composition, IOBA-HS culture medium, lacking animal serum and any other potentially harmful supplements for human use, is shown in Table 1.

2.2. Characteristics of LPCs obtained with the different culture media

Successful LPCs were obtained with the three culture media (CnT20, IOBA-FBS and IOBA-HS) tested. The percentage of confluent LPCs was higher when LPCs were incubated with IOBA-HS ($29.0 \pm 8.8\%$) than when CnT20 ($18.9 \pm 5.6\%$) or IOBA-FBS ($25.9 \pm 5.0\%$) were used. However, these differences were not statistically significant (Figure 16A). The LPC generation time was similar when CnT20 (24.3 ± 2.2 days), IOBA-FBS (25.8 ± 3.1 days), and IOBA-HS (28.9 ± 2.2 days) culture media were used (Figure 16B). The number of limbal explants incubated with each culture medium is shown in Table 8.

LPC cells obtained with the three culture media showed a homogeneous polygonal morphology, maintaining a size around $28 \times 50 \mu\text{m}$ (Figure 17). Occasionally, the cell outgrowths incubated with the three different culture media were larger and more elongated than normal and had an irregular morphology (data not shown).

Table 8. Limbal explants cultured from different human deceased donors.

	CnT20	IOBA-FBS	IOBA-HS
Different donors, n	11	8	10
Plated limbal explants, n	122	82	107

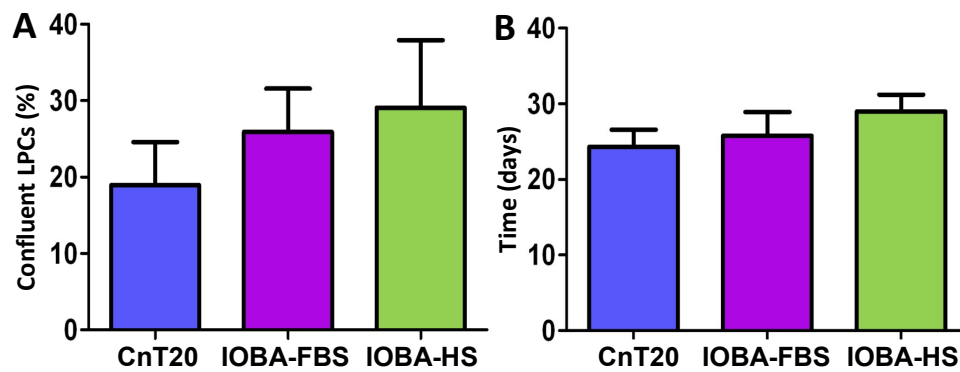


Figure 16. Characteristics of confluent LPCs obtained with CnT20, IOBA-FBS and IOBA-HS culture media. (A) There were no significant differences in the percentage of confluent LPCs obtained with the three culture media tested. (B) The LPC generation times were similar among the three culture media.

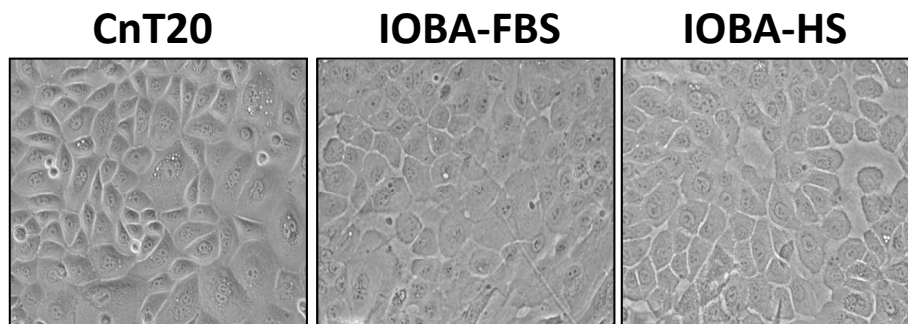


Figure 17. Characteristics of confluent LPCs obtained with CnT20, IOBA-FBS and IOBA-HS culture media. The LPCs incubated with the three culture media showed cuboidal and homogeneous cell morphology, typical of epithelial cells. Representative images captured by phase contrast microscope; magnification 20X.

2.3. Characterization of LPCs obtained with different culture media

Four or six LPCs from different donors were analyzed for each condition by immunofluorescence and real time RT-PCR, respectively.

2.3.1. LESC marker expression in LPCs

The relative expression of LESC mRNA markers was evaluated by real time RT-PCR. The mRNA expression levels of LPCs cultured with IOBA-FBS and IOBA-HS were compared to LPCs incubated with CnT20 control culture medium, which were assigned a value of 1. The relative mRNA expression of *K14* was significantly higher in LPCs cultured with CnT20 control culture medium than in LPCs cultured in IOBA-FBS and IOBA-HS ($p \leq 0.001$, Figure 18A), but was similar between the LPCs incubated with IOBA-FBS culture media (0.11 fold, Figure 18A) and with IOBA-HS culture media (0.10 fold, Figure 18A). However, *K15* relative mRNA expression was lower when control CnT20 culture medium was used, although significant differences were detected only when the expression levels were compared with those found in LPCs incubated with IOBA-HS (5.38 fold; $p \leq 0.05$). *K15* relative mRNA expression was similar in LPCs grown with IOBA-FBS (5.80 fold) and IOBA-HS (5.38 fold) (Figure 18A). On the other hand, similar to the *K14* marker, the relative mRNA expression of *ABCG2* and *p63 α* was significantly higher in LPCs cultured with CnT20 control culture medium compared to LPCs cultured in IOBA-FBS and IOBA-HS ($p \leq 0.001$, Figure 18A). However the relative mRNA expression of *ABCG2* and *p63 α* was similar for LPCs incubated with IOBA-FBS culture media (*ABCG2*, 0.10 fold; *p63 α* , 0.13 fold; Figure 18A) and with IOBA-HS culture media (*ABCG2*, 0.06 fold; *p63 α* ; 0.14 fold; Figure 18A).

By immunofluorescence microscopy, the percentage of cells that expressed *K14* protein was lower in LPCs incubated with CnT20 ($24.7 \pm 19.7\%$) than in LPCs incubated with IOBA-FBS ($30.6 \pm 17.8\%$) and IOBA-HS ($39.7 \pm 22.6\%$), although the differences were not statistically significant (Figures 18B and 19). In addition, the percentage of *K14*-positive cells in LPCs cultured with IOBA-FBS and with IOBA-HS was similar (Figures 18B and 19). The percentage of cells expressing *K15* protein marker was $8.1 \pm 7.9\%$ in LPCs cultured with control CnT20 media. Expression of *K15* was significantly higher in LPCs incubated with IOBA-HS ($13.5 \pm 11.4\%$) than with IOBA-FBS, where it was not detected (Figures 18B and 19). The percentage of *ABCG2*-positive cells was $16.5 \pm 6.3\%$ in LPCs incubated with CnT20 control culture medium, $12.0 \pm 6.6\%$ with IOBA-FBS, and $22.5 \pm 13.9\%$ with IOBA-HS, with no significant differences among them (Figures 18B and 19). Finally, the percentage of cells that expressed *p63* protein was lower in LPCs incubated with CnT20 ($0.4 \pm 0.4\%$) than in LPCs incubated with IOBA-FBS ($11.2 \pm 10.3\%$) or IOBA-HS ($11.0 \pm 11.0\%$), although there were no significant

differences (Figures 18B and 19). In addition, the percentage of p63-positive cells in LPCs cultured with IOBA-FBS and with IOBA-HS was similar (Figures 18B and 19).

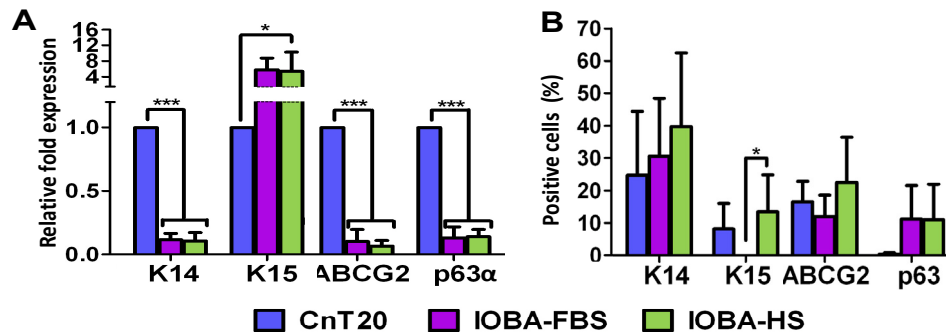


Figure 18. LESC marker expression in LPCs cultured with CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS culture media. (A) Real time RT-PCR results (n=6). The relative mRNA expression of the LESC markers was significantly higher when control CnT20 culture medium was used, except for *K15*, which was significantly higher in LPCs incubated with IOBA-HS than with CnT20. (B) Percentage of positive cells for each marker analyzed by immunofluorescence (n=4). There were no significant differences in the percentage of positive cells for ABCG2, p63, and K14 LESC protein markers when the different culture media were used. However, the percentage of cells positive for K15 protein marker was significantly higher when LPCs were incubated with IOBA-HS than with IOBA-FBS). Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; HS, human serum. * p<0.05; *** p<0.001.

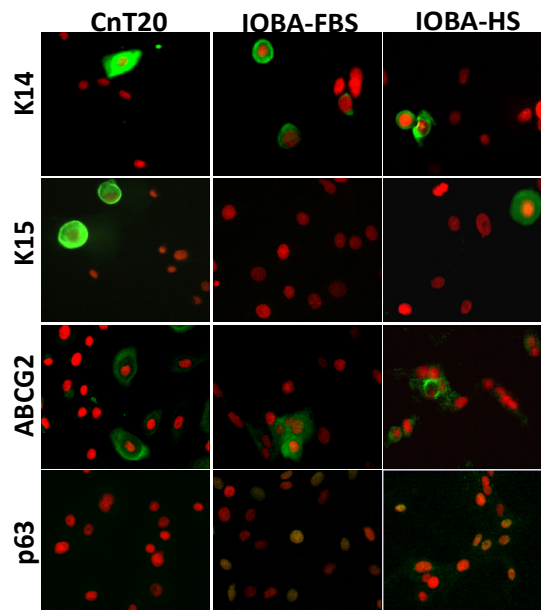


Figure 19. LESC marker expression in LPCs cultured with CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS culture media. There were no differences in the percentage of positive cells for ABCG2, p63, and K14 LESC protein markers when the different culture media were used. However, the protein K15 was not detected when LPCs were incubated with IOBA-FBS. Representative images of immunofluorescence microscopy; magnification 40X. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). ABCG2, K14, and K15 protein expression is shown in green, while p63 is shown in yellow (red and green fluorescence co-localization). Abbreviations: LESC, limbal epithelial stem cells; LPC, limbal primary culture; FBS, fetal bovine serum; HS, human serum.

2.3.2. Corneal epithelial cell marker expression in LPCs

mRNA expression of LPCs cultured with IOBA-FBS and IOBA-HS culture media was compared to that in LPCs cultured with control CnT20 culture medium (Figure 20A). The relative expression of *K3* mRNA was significantly higher when CnT20 was used ($p \leq 0.001$). *K3* mRNA expression level was similar in LPCs incubated with IOBA-FBS and IOBA-HS culture media (0.003 fold, Figure 20A). On the other hand, the relative expression of *K12* mRNA was lower in LPCs cultured with CnT20 culture medium than in LPCs incubated with IOBA-FBS (7.47 fold) and with IOBA-HS culture media (17.45 fold), although the differences were not significant (Figure 20A).

By immunofluorescence microscopy, in contrast to the relative mRNA expression observed for *K3*, there were no significant differences in the percentage of *K3*-positive cells in LPCs cultured with CnT20 ($40.4 \pm 14.3\%$), IOBA-FBS ($52.3 \pm 8.7\%$), and IOBA-HS ($68.5 \pm 8.7\%$) (Figures 20B and 21). Likewise, the percentage of *K12*-positive cells was similar in the LPCs incubated with the three culture media (CnT20, $13.8 \pm 9.9\%$; IOBA-FBS, $18.0 \pm 9.2\%$, IOBA-HS, $27.1 \pm 13.6\%$; Figures 20B and 21).

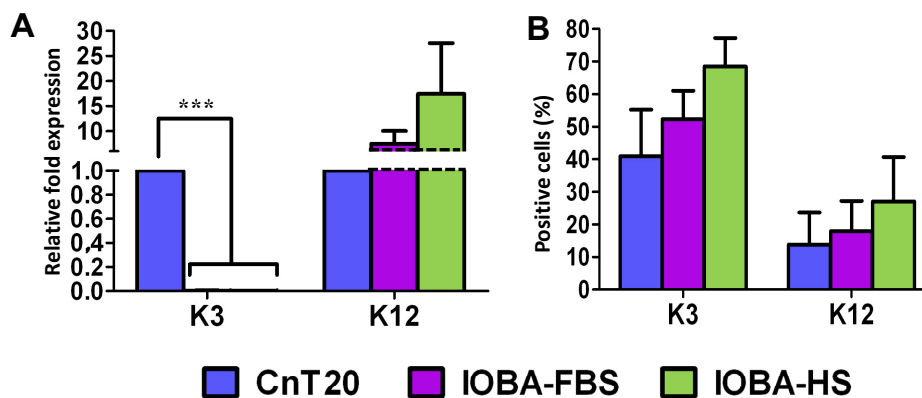


Figure 20. Differentiated corneal epithelial cell marker expression in LPCs cultured with CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS culture media. (A) Real time RT-PCR results ($n=6$). The relative mRNA expression of *K3* was significantly higher when CnT20 was used, while significant differences were not detected in the relative mRNA expression of *K12*. (B) Percentage of positive cells for each analyzed marker by immunofluorescence microscopy ($n=4$). There were no significant differences in the percentage of positive cells for *K3* and *K12* protein marker when the three culture media were used. Abbreviations: LPC, limbal primary culture; FBS, fetal bovine serum; HS, human serum. *** $p \leq 0.001$.

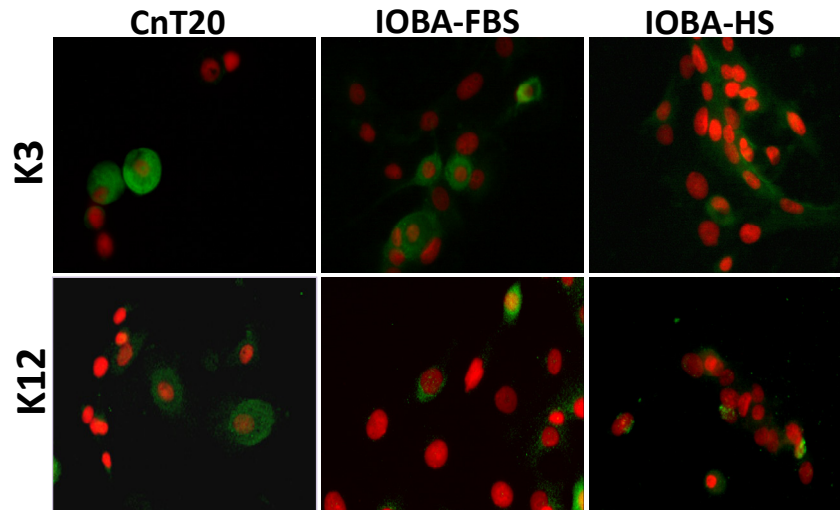


Figure 21. Corneal epithelial differentiated cell markers expression in LPCs cultured with CnT20, IOBA-FBS and IOBA-HS culture media. Immunofluorescence results. There were no differences in the percentage of positive cells for K3 and K12 protein marker when the three culture media were used. Representative images of immunofluorescence technique; magnification 40X. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). K3 and K12 protein expression is shown in green. Abbreviations: LPC, limbal primary culture; FBS, fetal bovine serum; HS, human serum.

2.3.3. Characterization of non-epithelial cells in LPCs

The expression of *S100A4* mRNA was confirmed by real time RT-PCR for LPCs incubated in all three culture media. Compared to LPCs incubated with CnT20, the highest relative expression of *S100A4* mRNA was detected with IOBA-HS; however, there were no significant differences among the culture media (Figure 22A). The highest percentage of *S100A4*-positive cells was with CnT20 ($33.6 \pm 11.4\%$), while the lowest was with IOBA-HS ($16.2 \pm 8.5\%$), although the differences were not significant (Figure 22B and C). PECAM, MART-1, and CD11c protein markers were not detected in the LPCs (Figure 22C). However, the fibroblast marker *S100A4* was expressed in LPCs incubated with all three culture media.

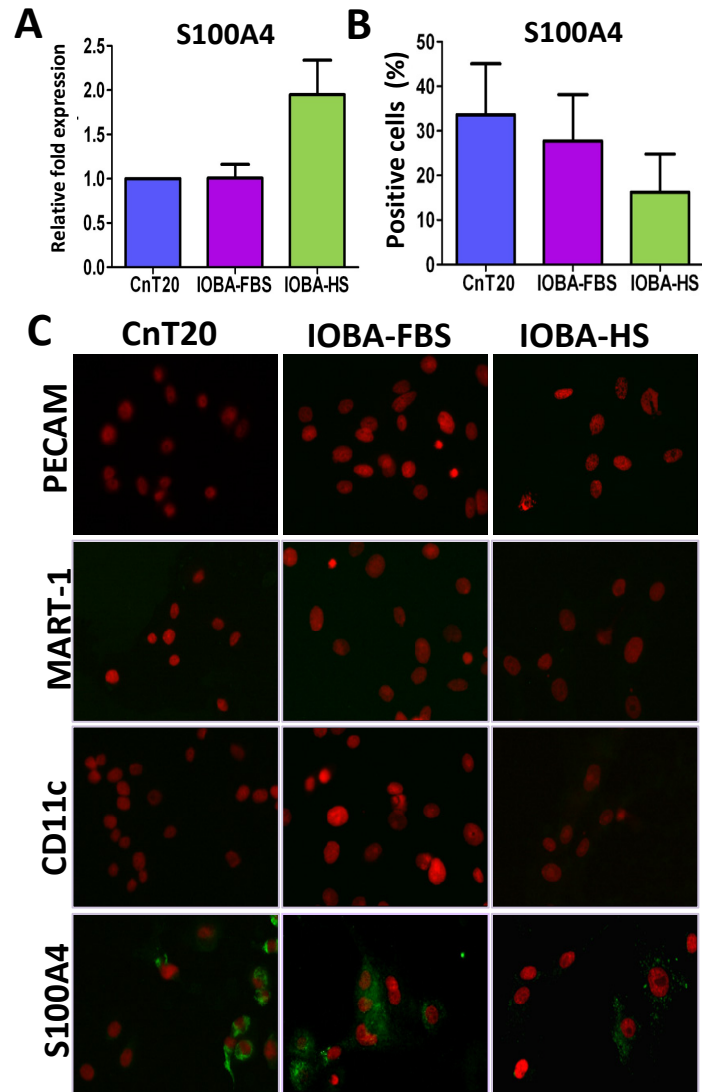


Figure 22. Characterization of non-epithelial cells in LPCs cultured with CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS culture media. (A) Real time RT-PCR results for *S100A4* marker (n=6). Relative expression of *S100A4* mRNA was detected when all three culture media were used (A). (B) Percentage of positive cells for *S100A4* protein (n=4). (B and C) *S100A4* protein was detected in LPCs incubated with all three culture media; (C) however, the LPCs incubated with CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS did not express PECAM, MART-1, or CD11c protein markers. Representative images of immunofluorescence microscopy (magnification 40X, nuclei in red and protein expression (in green). Abbreviations: LPC, limbal primary culture; FBS, fetal bovine serum; HS, human serum.

2.4. Consecutive expansion of a single limbal explants using IOBA-HS culture medium

2.4.1. Consecutive LPC characteristics

Three confluent LPCs (LPC0 to LPC2) were obtained from consecutive expansion of single limbal explants cultured with IOBA-HS (Figure 23A). The percentage of confluent LPCs increased significantly from LPC0 ($29.0 \pm 8.8\%$) to LPC1 ($85.9 \pm 6.8\%$) ($p \leq 0.01$), and then decreased in LPC2 ($60.5 \pm 15.2\%$), although not significantly (Figure 23A). The elapsed time from limbal explant initiation to removal was significantly higher in LPC0 (14.5 ± 1.4 days) than in LPC1 (6.4 ± 1.4 days) and LPC2 (8.3 ± 1.5 days, $p \leq 0.01$, Figure 23B). In a similar way, the LPC total generation time was significantly higher in LPC0 (28.9 ± 2.2 days) than in the consecutive LPCs (LPC1, 17.1 ± 1.2 days, $p \leq 0.01$; LPC2, 16.9 ± 1.6 days, $p \leq 0.01$; Figure 23B). The total number of LEs plated and confluent LPCs obtained is shown in Table 9.

Table 9. Number of limbal explants plated and successful (confluent) LPCs obtained in the different consecutive limbal explant passages with IOBA-HS culture medium. LPCs, limbal primary cultures.

	LPC0	LPC1	LPC2
Donors, n	10	7	6
Plated limbal explants, n	107	41	33
Confluent LPCs	39	33	21

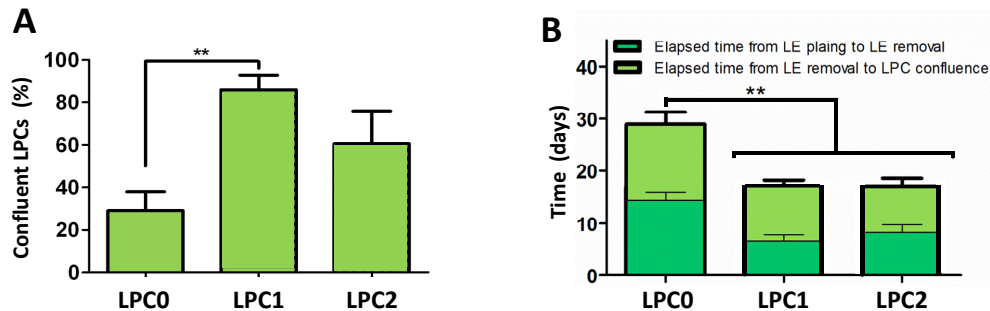


Figure 23. Characteristics of consecutive LPCs obtained from single limbal explants cultured with IOBA-HS culture medium. (A) The percentage of confluent LPCs increased significantly from LPC0 to LPC1. (B) The LPC total generation time decreased significantly from LPC0 to LPC1-LPC2. Abbreviations: LE, limbal explant; LPC, limbal primary culture; HS, human serum. ** $p \leq 0.01$.

The cell outgrowths from limbal explants had a homogeneous cuboidal morphology in LPC0 and LPC1 (Figure 24). Quite often, cell outgrowth continued with similar morphology in LPC2, although sometimes the cell morphology was more elongated.

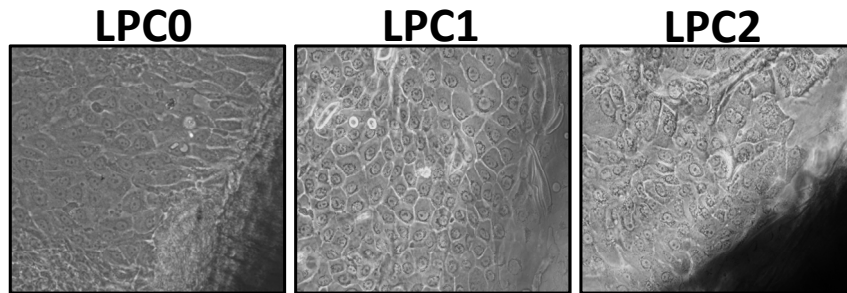


Figure 24. Characteristics of consecutive LPCs obtained from single limbal explants cultured with IOBA-HS culture medium. Cell outgrowths showed a homogeneous cuboidal morphology in LPC0 and LPC1. Representative images captured by phase contrast microscope; magnification 20X. Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

2.4.2. Characterization of consecutive LPCs

Four or six LPCs from different donors were analyzed for each condition by immunofluorescence microscopy and real time RT-PCR, respectively.

2.4.2.1. LESC marker expression in consecutive LPCs

The mRNA expression level for LESC marker proteins in LPC1 and LPC2 was compared to that in LPC0, which was assigned a value of 1. The relative expression of *K14* mRNA increased from LPC0 to LPC1 (1.31 fold), but the difference was not significant. It then decreased significantly to 0.07 fold in LPC2 (LPC0 vs LPC2, $p \leq 0.05$; LPC1 vs LPC2, $p \leq 0.001$; Figure 25A). The relative expression of *K15* mRNA was similar in LPC0 and LPC1 (with an average of 1.08 fold). It then decreased to 0.04 fold in LPC2 (LPC0 vs LPC2, $p \leq 0.05$; LPC1 vs LPC2, $p \leq 0.001$; Figure 25A). The relative expression of *ABCG2* mRNA decreased from LPC0 to LPC1 (0.70 fold), and increased in LPC2 (1.65 fold), but the changes were not statistically significant (Figure 25A). The relative expression of *p63 α* mRNA decreased significantly from LPC0 through LPC2 (0.006 fold) (LPC0 vs LPC1, $p \leq 0.05$; LPC0 vs LPC2, $p \leq 0.01$; Figure 25A).

The percentage of cells positive for the LESC marker K14 was similar in all the consecutive LPCs, with an average of $37.8 \pm 2.3\%$ (Figures 25B and 26). The percentage of K15-positive

cells increased from LPC0 ($13.5 \pm 11.4\%$) to LPC1 ($29.4 \pm 17\%$), but the difference was not significant. It then decreased to an undetectable level in LPC2 ($p \leq 0.05$; Figures 25B and 26). The percentage of ABCG2-positive cells increased significantly from LPC0 ($22.5 \pm 13.9\%$) to LPC1 ($94.7 \pm 2.0\%$). While it decreased significantly in LPC2 ($58.3 \pm 21.4\%$; $p \leq 0.05$; Figures 25B and 26), it remained significantly higher in LPC2 than in LPC0 ($p \leq 0.05$, Fig. 5B). p63 protein expression was only detected in LPC0 ($11.0 \pm 11.0\%$; Figures 25B and 26).

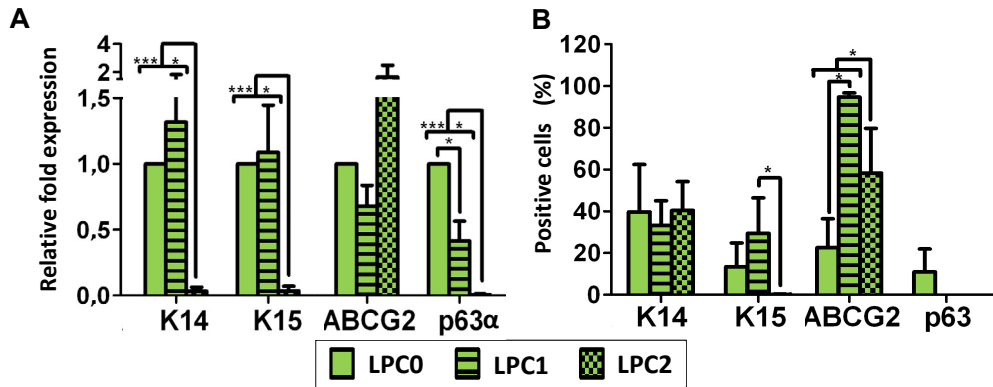


Figure 25. LESC marker expression in consecutive LPCs cultured with IOBA-HS culture medium. (A) Real time RT-PCR results ($n=6$). Except for ABCG2, the relative mRNA expression of all the analyzed LESC markers was significantly higher in LPC0-LPC1 than in LPC2. (B) Percentage of positive cells for each analyzed marker ($n=4$). The percentage of positive cells for ABCG2 protein marker increased significantly from LPC0 to LPC1, but then decreased significantly in LPC2. p63 protein marker was only detected in LPC0. The percentage of positive cells for K14 was similar in all LPCs. The percentage of K15-positive cells decreased significantly in LPC2. Abbreviations: LPC, limbal primary culture; HS, human serum; LESC, limbal epithelial stem cells. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

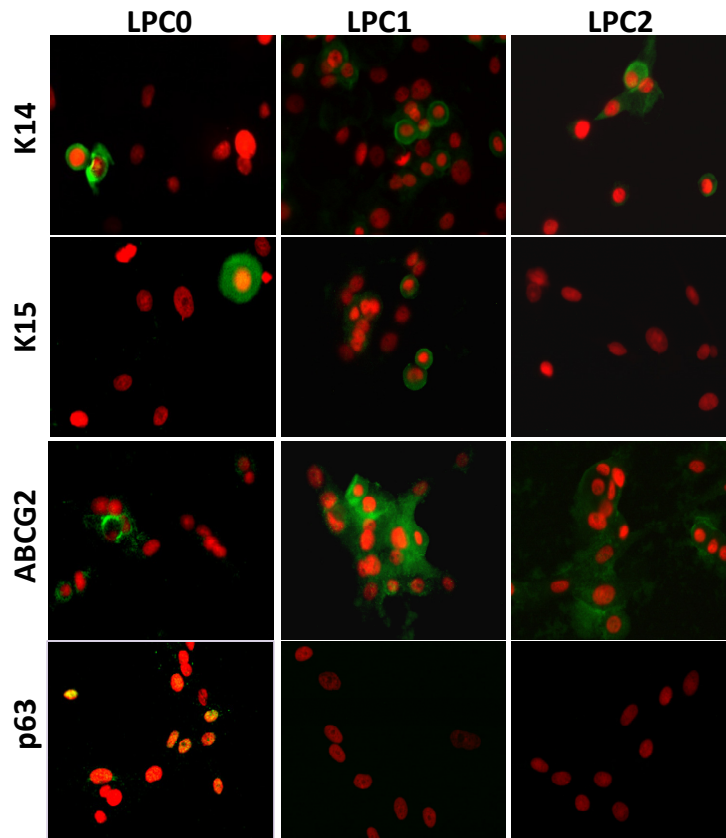


Figure 26. LESC marker expression in consecutive LPCs cultured with IOBA-HS culture medium. The percentage of positive cells for ABCG2 protein marker increased from LPC0 to LPC1, but then decreased significantly in LPC2. p63 protein marker was only detected in LPC0. The percentage of positive cells for K14 was similar in all LPCs. The percentage of K15-positive cells decreased significantly in LPC2. Representative images of immunofluorescence microscopy; magnification 40X. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). ABCG2, K14, and K15 protein expression are shown in green, while p63 is shown in yellow (red and green fluorescence co-localization). Abbreviations: LPC, limbal primary culture; LESC, limbal epithelial stem cells.

2.4.2.2. Corneal epithelial cell marker expression in consecutive LPCs

The mRNA expression level of each LPC was compared to that in LPC0. The increase in relative expression of *K3* mRNA from LP0 to LPC1 (1.7 fold) was not significant, but the decrease in LPC2 was (0.07 fold, $p \leq 0.001$, Figure 27A). The relative mRNA expression of *K12* was similar in LPC0 and LPC1 (0.9 fold), but then decreased significantly in LPC2 (0.002 fold, $p \leq 0.001$, Figure 27A).

By immunofluorescence microscopy, the percentage of K3-positive cells was $68.5 \pm 8.7\%$ in LPC0. It increased to $83.4 \pm 2.1\%$ in LPC1, but the change was not significant ($p > 0.05$, Figures 27B and 28). It then decreased significantly to $47.9 \pm 9.3\%$ in LPC2 ($p \leq 0.05$, Figures 27B and 28). The percentage of K12-positive cells was similar in all LPCs, with an average of $29.4 \pm 1.6\%$ (Figures 27B and 28).

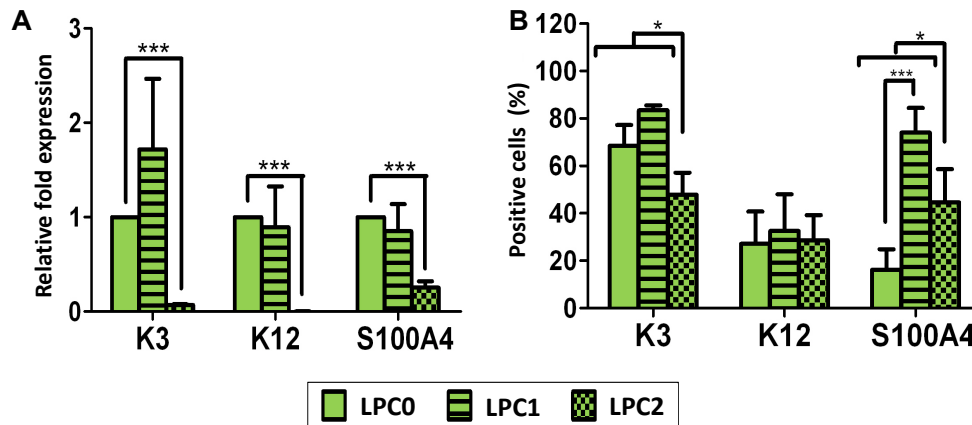


Figure 27. Differentiated corneal epithelial cell and fibroblast marker expression in consecutive LPCs cultured with IOBA-HS culture medium. (A) Real time RT-PCR results ($n=6$). The relative mRNA expression of the corneal markers *K3* and *K12* and of the fibroblast marker *S100A4* decreased significantly in LPC2. (B) Percentage of positive cells for each analyzed marker ($n=4$). The percentage of positive cells for *K3* decreased significantly in LPC2, while *K12* was similar in all of the consecutive LPCs. The percentage of positive cells for *S100A4* protein marker increased significantly from LPC0 to LPC1, then decreased significantly in LPC2. Abbreviations: LPC, limbal primary culture. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

2.4.2.3. Fibroblast marker expression in consecutive LPCs

The fibroblast marker *S100A4* mRNA and protein were present in all LPCs (Figures 27 and 28). The relative expression of *S100A4* mRNA decreased significantly from LPC0 to LPC2 (0.25 fold, $p \leq 0.001$, Figure 27A). However, the percentage of *S100A4*-positive cells increased significantly from LPC0 ($16.2 \pm 8.6\%$) to LPC1 ($74.0 \pm 12.0\%$, $p \leq 0.001$), and decreased significantly in LPC2 ($44.6 \pm 16.5\%$; $p \leq 0.05$; Figures 27B and 28).

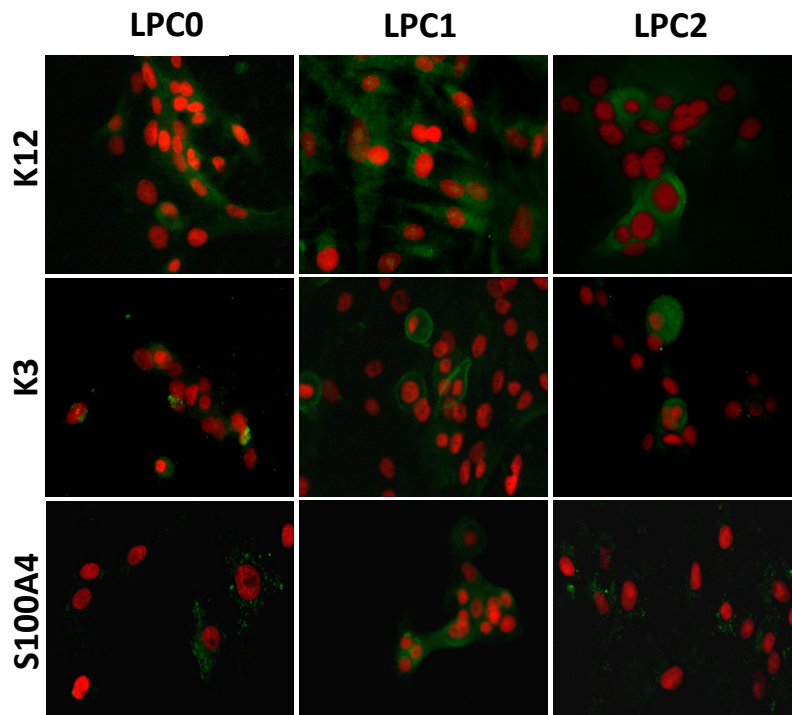


Figure 28. Differentiated corneal epithelial cell and fibroblast marker expression in consecutive LPCs cultured with IOBA-HS culture medium. The percentage of positive cells for K3 decreased in LPC2, while K12 was similar in all of the consecutive LPCs. The percentage of positive cells for S100A4 protein marker increased from LPC0 to LPC1, then decreased significantly in LPC2. Representative images of immunofluorescence microscopy; magnification 40X. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). K3, K12, and S100A4 protein expression is shown in green. Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

► In summary, all LPCs cultured with the three media presented cuboidal cell morphology. There were no differences in the percentage of cells positive for the limbal proteins ABCG2, p63, and K14 or corneal proteins K3 and K12 as determined by immunofluorescence microscopy. Relative mRNA expression of corneal markers was higher in CnT20-cultured cells, except for *K12*. Expression of the LESC marker K15 was significantly higher in IOBA-HS cultured cells. PECAM (endothelial cells), MART-1 (melanocytes), and CD11c (dendritic cells) proteins were not detected, whereas fibroblast protein S100A4 was detected in cells incubated in each of the three culture media.

Finally, using IOBA-HS culture medium, limbal explants could be consecutively cultured, obtaining LPC0, LPC1, and LPC2. LPC1 showed similar characteristics to LPC0, while LPC2 cell morphology became elongated and expression of some LESC markers was diminished.

OBJECTIVE 3

The third objective was to determine which isolation technique rendered the highest recovery of LPC LESC from the limbal niche. To address this objective, LPCs were incubated with the biosafe IOBA-HS culture medium (Table 1). Cell isolation by limbal explant or single cell suspension was randomly assigned for each limbal ring to minimize the effect of biological variability in our results. There were no significant differences in donor age and or in the elapsed time between death and the onset of cell expansion. The total number of donors, their characteristics, as well as the number of LPCs established using both isolation techniques are shown in Table 10.

Table 10. Limbal primary cultures (LPCs) generated from different cell isolation techniques. Time of limbal tissue storage: elapsed time between donor death and the onset of cell expansion.

Characteristics	Explants	Cell suspensions	p-value
Number of donors	17	18	-
Donor age (years)	70.5 ± 5.4	73.8 ± 5.2	p>0.05
Time of limbal tissue storage (days)	5.20 ± 0.65	5.06 ± 0.60	p>0.05
Number of started LPCs	208	61	-
Number of confluent LPCs	91	51	-
Percentage of confluent LPCs	40.03% ± 6.08%	94.73% ± 5.26%	p≤0.001
Elapsed time to confluence	19.61 ± 0.79	13.10 ± 0.69	p≤0.001
Total number of cells in confluent LPCs	177,525 ± 8,805	283,134 ± 22,059	p≤0.001
Cell viability in confluent LPCs	93.99% ± 1.50%	94.80% ± 0.99%	p>0.05

3.1. Characteristics of LPCs from explants and cell suspensions

Confluent LPCs were successfully established from both explants and cell suspensions. Limbal explants yielded a significantly lower percentage of confluent LPCs than did cell suspensions (Table 10) and required a longer amount of time to achieve confluence (Table 10 and Figure 29A). In addition, the total number of cells in confluent LPCs from explants was significantly lower than in those from cell suspensions (Table 10 and Figure 29B). The cell viability was similar for the two isolation procedures (Table 10 and Figure 29C).

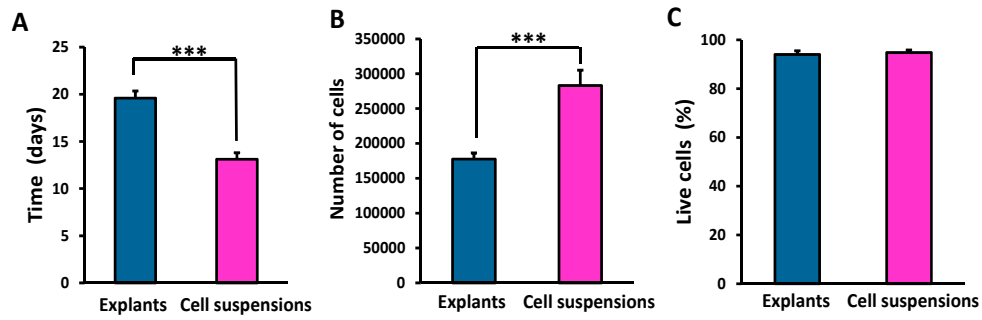


Figure 29. Performance of limbal primary cultures established from explants and cell suspensions. (A) The elapsed time to achieve LPC confluence was significantly lower when the cell suspension technique was used. (B) The number of cells in confluent LPCs was significantly lower when the cultures were established from limbal explants. (C) Cell viability was similar for both isolation procedures. *** $p \leq 0.001$.

By phase contrast microscopy, we observed that the LPCs cells obtained from both isolation techniques had a homogeneous cuboidal morphology. However, the cells of the LPCs generated from explants were significantly larger than the cells generated from cell suspensions (Figure 30A and B).

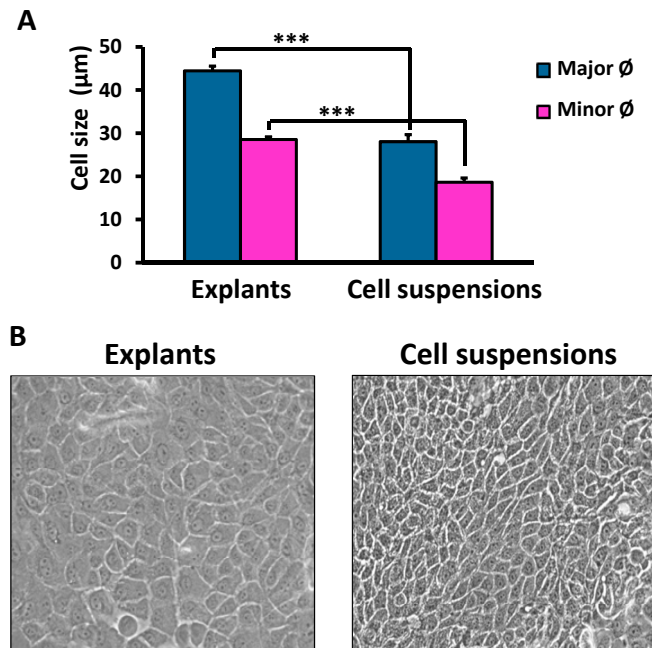


Figure 30. Cell size and morphology in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) The cell size was calculated measuring the major and minor cell diameters. (A and B) The cells were significantly larger in the LPCs obtained from explants. (B) The cell morphology was homogeneous and cuboidal in both culture conditions. Abbreviations: LPC, limbal primary culture; Ø, diameter. *** $p \leq 0.001$.

Cell morphology was also analyzed by transmission electron microscopy (n=2). The cells obtained from either technique had a sparse cytoplasm containing few mitochondria and ribosomes, a nucleus with a well-defined nucleoli, prominent intermediate filaments (Figure 31C and G), and numerous intercellular junctions, mainly desmosomes (Figure 31B and F). In addition, primary lysosomes (Figure 31A and E) and microvilli (Figure 31D and H) were observed in both cases.

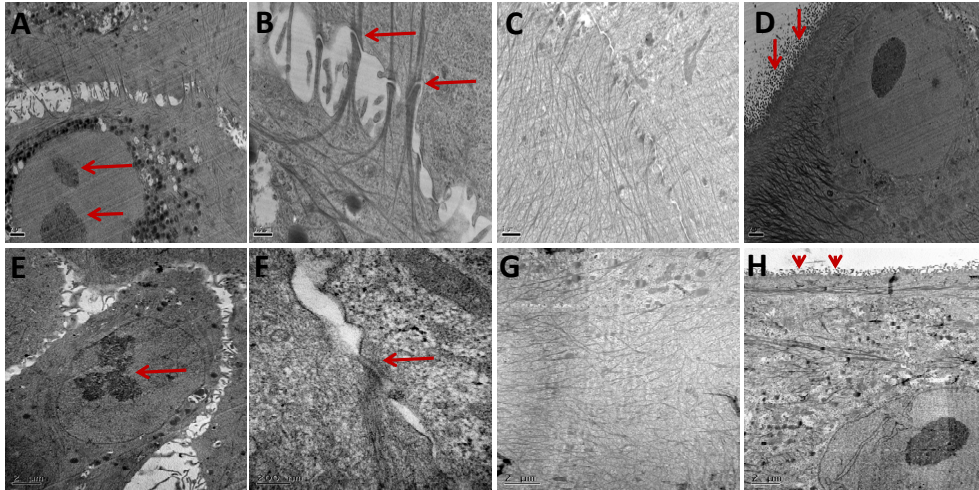


Figure 31. Transmission electron micrographs of LPCs generated from limbal explants and cell suspensions. There were no differences between cells obtained from (A - D) limbal explants and cells retrieved from (E - H) cell suspensions. Well defined (A and E, red arrows) nucleoli, (A and E) primary lysosomes, (B and F, red arrows) desmosomes, and (C and G) intermediate filaments were present. (D and H, red arrow-heads) LPC cells derived by both techniques had microvilli.

3.2. Characterization of LPCs from explants and cell suspensions

Four or six LPCs from different donors were analyzed for each condition by immunofluorescence microscopy and real time RT-PCR, respectively.

3.2.1. LESC marker expression in LPCs

Expression of LESC markers K14, K15, ABCG2, and p63 α protein and mRNA was detected by immunofluorescence microscopy and real time RT-PCR, respectively. For real time RT-PCR, the expression of each marker in the LPCs generated from limbal explants was used as the calibrator for the LPCs established from cell suspensions. The results were reported as a fold up-regulation or fold down-regulation when the fold-change was greater or less than 1, respectively.

Relative mRNA expression of *K14* was similar when the LPCs were obtained from explants and cell suspensions (0.86 fold, Figure 32A). However, the percentage of cells positive for this protein was significantly lower for LPCs derived by the explant technique ($62.26 \pm 13.26\%$) than the cell suspension technique ($99.34 \pm 0.42\%$, $p \leq 0.05$, Figures 32B and 33).

On the other hand, the mRNA expression of *K15* was lower in LPCs obtained from explants than from cell suspensions (1.8 fold, $p \leq 0.05$, Figure 32A). Moreover, the percentage of cells that expressed the *K15* protein was significantly lower in the LPCs generated from limbal explants ($18.70 \pm 10.40\%$) than from cell suspensions ($51.89 \pm 5.10\%$, $p \leq 0.005$ Figures 32B and 33).

The relative mRNA expression of *ABCG2* was similar in LPCs obtained by both isolation techniques (Figure 32A). On the other hand, the protein *ABCG2* was expressed by $57.33 \pm 20.54\%$ of the cells cultured from explants. Although this percentage was higher in the LPCs obtained from cell suspensions ($85.47\% \pm 8.53$), the difference was not significant (Figures 32B and 33).

Finally, the expression of *p63 α* was analyzed. The mRNA expression of this marker was significantly higher in the LPCs obtained by the explant technique than the cell suspensions (0.79 fold, $p \leq 0.05$, Figure 32A). However, the *p63 α* protein was not detected in LPCs established from explants, while the $42.76 \pm 14.50\%$ of the cells in the LPCs cultured from cell suspensions expressed this protein (Figure 32B and 33).

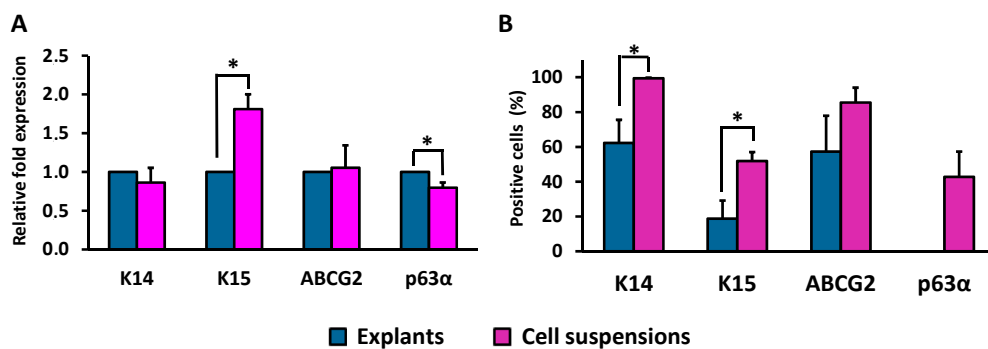


Figure 32. LESC marker expression in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) The relative mRNA expression of *K14* and *ABCG2* was similar for both techniques, while *K15* was more highly expressed in LPCs generated from cell suspensions and *p63 α* was more highly expressed in LPCs generated from limbal explants. These differences were statistically significant. (B) The percentage of positive cells for *K14*, *K15*, and *ABCG2* proteins was higher in the LPCs obtained from cell suspensions; however, these differences were only significant for *K14* and *K15*. The *p63 α* protein was only detected in the LPCs generated from cell suspensions. Abbreviations: LPC, limbal primary culture. * $p \leq 0.05$.

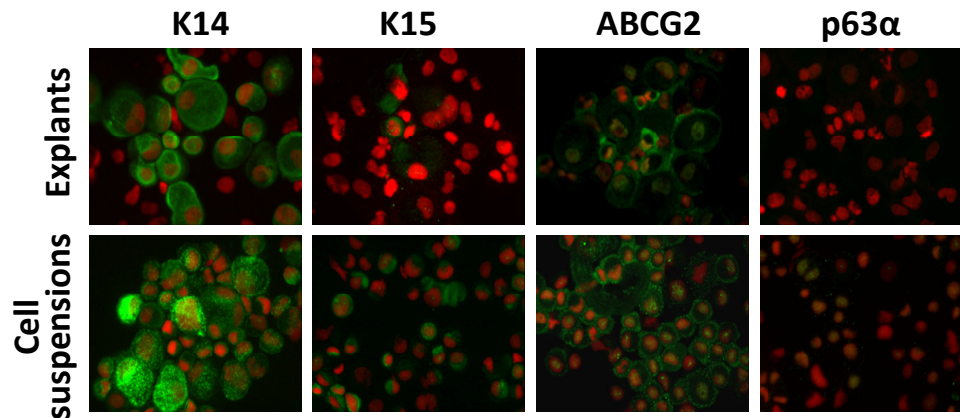


Figure 33. LESC marker expression in LPCs established from explants and cell suspensions. Representative immunofluorescence microscopy images (40X) for K14, K15, ABCG2, and p63 α proteins in LPCs generated from limbal explants and single cell suspensions. ABCG2, K14, and K15 protein expression are shown in green, while p63 is shown in yellow (red and green fluorescence co-localization). (Nuclei were counterstained with propidium iodide (red)). Abbreviations: LPC, limbal primary culture; LESC, limbal epithelial stem cells.

3.2.2. Corneal epithelial cell marker expression in LPCs

Expression of corneal epithelial cell markers K3 and K12 protein and mRNA was detected by immunofluorescence microscopy and real time RT-PCR, respectively. In real time RT-PCR analysis, the expression for each marker in LPCs obtained from explants served as the calibrator for LPCs generated from cell suspensions. The results were reported as a fold up-regulation or fold down-regulation when the fold-change was greater or less than 1, respectively.

Although the mRNA expression of *K3* was lower in LPCs derived from explants compared to cell suspensions (3.27 fold), the difference was not statistically significant (Figure 34A). The percentage of positive cells for K3 protein was similar in the LPCs obtained using both cell isolation techniques (62.85% \pm 11.53% from explants, 57.79% \pm 14.74 from cell suspensions, Figures 34B and 35).

On the other hand, the relative expression of *K12* mRNA was similar in LPCs established from explants and cell suspensions (1.25 fold) (Figure 34A). In addition, the percentage of cells positive for this marker was similar for the two techniques (65.63% \pm 1.68 for explants, 68.70% \pm 23.15% for cell suspensions, Figures 34B and 35).

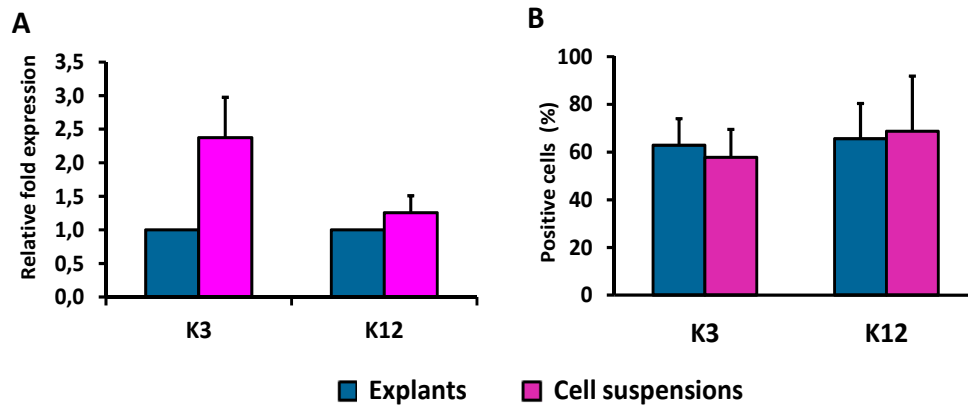


Figure 34. Corneal epithelial cell marker expression in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) The relative mRNA expression of *K3* and *K12* was higher in the LPCs established from cell suspensions, although the differences were not statistically significant. (B) On the other hand, the percentage of positive cells for *K3* and *K12* markers was similar in the LPCs obtained by each technique. Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

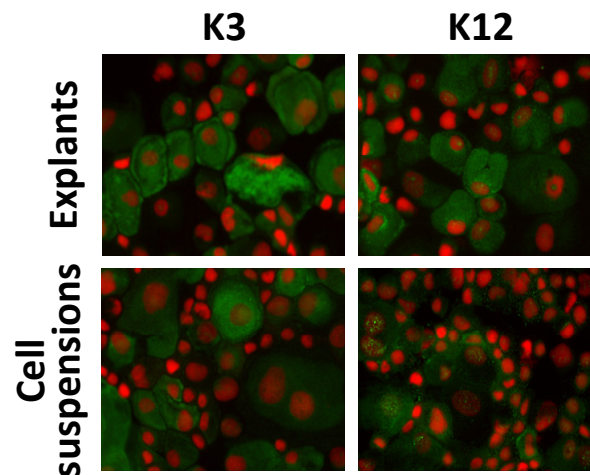


Figure 35. Corneal epithelial cell marker expression in LPCs established from explants and cell suspensions. The percentage of positive cells for *K3* and *K12* markers was similar in the LPCs obtained by each technique. Representative images of immunofluorescence assays (40X) to detect *K3* and *K12* proteins (green fluorescence) in LPCs established from limbal explants and single cell suspensions. Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

3.2.3. Characterization of non-epithelial cells in LPCs

The limbal fibroblast *S100A4* marker was expressed in LPCs generated by both cell isolation protocols. The relative mRNA expression of *S100A4* was significantly higher in LPCs derived from explants ($p \leq 0.01$, Figure 36A). The percentage of cells positive for the protein was higher in LPCs obtained from explants, although the differences were not significant (Figure 36B). Protein markers for endothelial cells (PECAM), melanocytes (MART-1), and dendritic cells (CD11c) were not detected in any of the LPCs (Figure 36C).

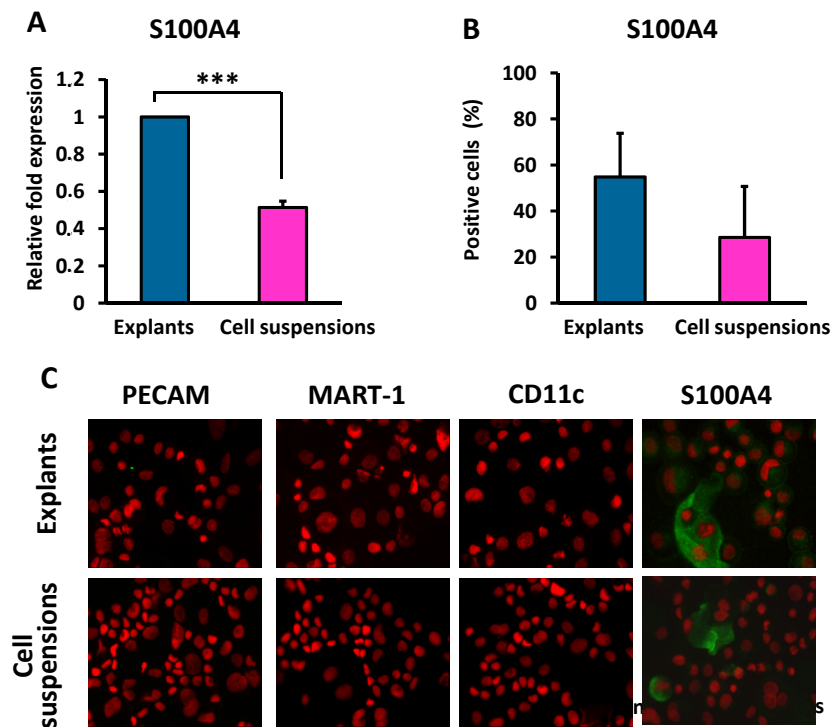


Figure 36. Detection of non-epithelial cells in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) The relative mRNA expression of *S100A4* was significantly higher in LPCs derived from explants. (B and C) The *S100A4* protein was detected in cells derived by both cell isolation protocols. (C) Specific proteins for endothelial cells (PECAM), melanocytes (MART-1), and dendritic cells (CD11c) were not detected in the LPCs obtained by either cell isolation protocols. (C) Representative images (40X) of immunofluorescence microscopy assays for PECAM, MART-1, CD11c, and *S100A4* proteins (green fluorescence). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red). Abbreviations: LPC, limbal primary culture. *** $p \leq 0.001$.

3.3. Functional analysis of LPCs from explants and cell suspensions

The number of cells necessary to perform the clonogenicity assays is low; therefore, only a single confluent LPC from each culture condition was required. For these experiments, half of a limbal ring was used to cultivate explants and the other half was used to generate the cell suspension.

3.3.1. Cell proliferation marker Ki67 expression in LPCs

The percentage of cells positive for the proliferation marker Ki67 was similar in the LPCs established from explants ($64.67\% \pm 8.56\%$) and cell suspensions ($56.55\% \pm 9.15\%$, Figure 37A). Four LPCs from different donors were analyzed for each condition.

3.3.2. CFE in LPCs

The CFE was analyzed to determine the minimum number of cells that could originate new colonies. The CFE was significantly higher in LPCs established from cell suspensions ($n=8$, $8.31\% \pm 1.37\%$) than from explants ($n=5$, $1.00\% \pm 0.23\%$, $p \leq 0.05$, Figure 37B).

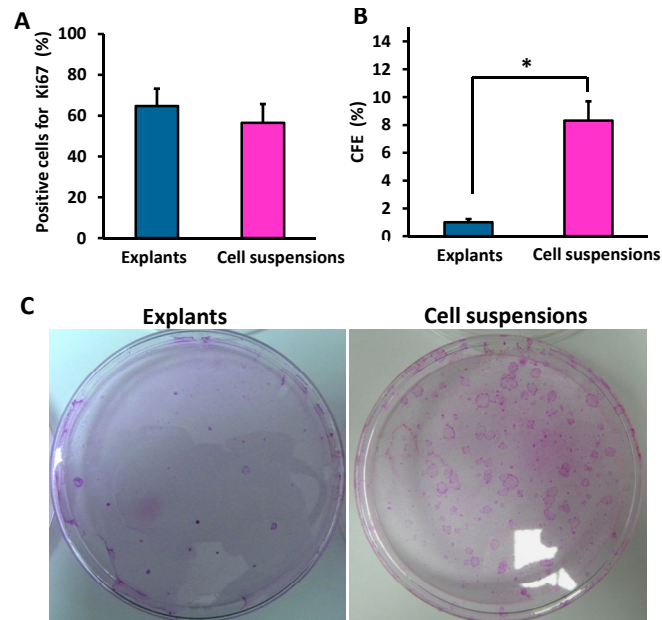


Figure 37. Cell proliferation marker Ki67 expression and colony forming efficiency (CFE) in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) The percentage of cells positive for Ki67 protein was similar for both cell isolation techniques. (B) The CFE was significantly higher in the LPCs established from cells suspension than from explants. (C) Representative images of colonies fixed and stained with rhodamine B. Abbreviations: LPC, limbal primary culture. * $p \leq 0.05$.

Table 11. Results from clonal analysis: holoclones, meroclones, and paraclones.

Explants						
Donors	CFE (%)	Trypsinized colony size (µm)	*	Holoclone	Meroclone	Paraclone
1	0.6	822 ± 136	0/10	0%	0%	100%
2	10.5	942 ± 100	1/10	0%	0%	100%
3	1.4	586 ± 62	0/10	0%	0%	100%
4	0.4	688 ± 68	0/10	0%	0%	100%
Mean ± SEM	3.2 ± 2.4	760 ± 78	0.2/10	0%	0%	100%

Cell suspensions						
Donors	CFE (%)	Trypsinized colony size (µm)	*	Holoclone	Meroclone	Paraclone
1	7.0	753 ± 54	3/10	0%	20%	80%
2	5.6	852 ± 104	3/10	0%	10%	90%
3	17.8	904 ± 58	3/10	0%	10%	90%
4	10.4	859 ± 74	1/10	0%	0%	100%
Mean ± SEM	10.2 ± 2.7	842 ± 32	2.5/10	0%	10% ± 4%	90% ± 4%

* Number of colonies that originated new colonies/Number of colonies trypsinized

3.3.3. Clonal analysis: holoclones, meroclones, and paraclones

The colonies obtained from confluent LPCs established from explants or cell suspensions were analyzed to determine if they were holoclones (from undifferentiated cells), meroclones (from transient amplified cells), or paraclones (from differentiated cells). Based upon Barrandon and Green assays,⁸⁷ transferred clones that gave rise to <5% aborted colonies were defined as “holoclones”. For transferred clones that formed no colonies or only terminal colonies, the clones were classified as “paraclones”. When more than 5% but less than 100% of the colonies were terminal, the clones were classified as a “meroclones”.

The cells derived from confluent LPCs produced by explants generated only paraclones (100%, Table 11, Figures 38 and 39). However, the percentage of paraclones derived from LPCs established from cell suspensions was 90% ± 4.0% (Table 11, Figures 38 and 39), and the remaining 10% ± 4.0% were meroclones (Table 11, Figures 38 and 39). Therefore, the percentage of meroclones was significantly higher in the LPCs obtained from cell suspensions compared to explants (p<0.05). In addition, paraclones generated from limbal explant-derived LPCs originated no colonies, while the paraclones generated from LPCs derived from cell suspensions originated new colonies, although all of them were terminal (Figure 39). None of the LPC-derived cells produced holoclones.

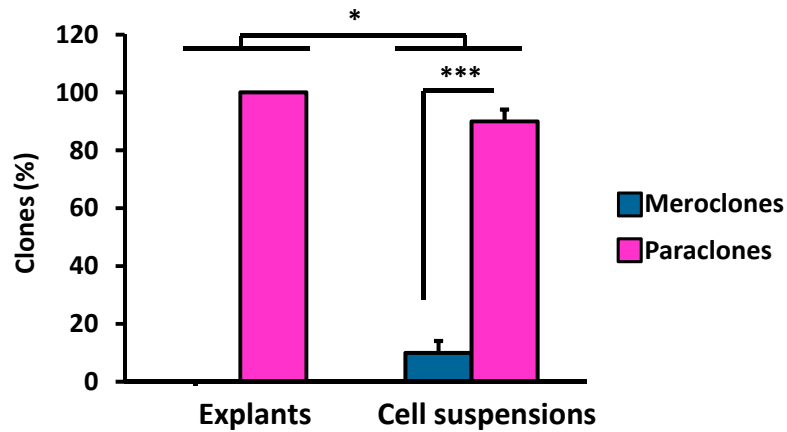


Figure 38. Clonal analysis of LPCs established from explants and cell suspensions. The cells from confluent LPCs obtained from explants generated only paraclones (100%), while the cells from confluent LPCs established from cell suspension originated paraclones and meroclones. Abbreviations: LPC, limbal primary culture. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.0001$.

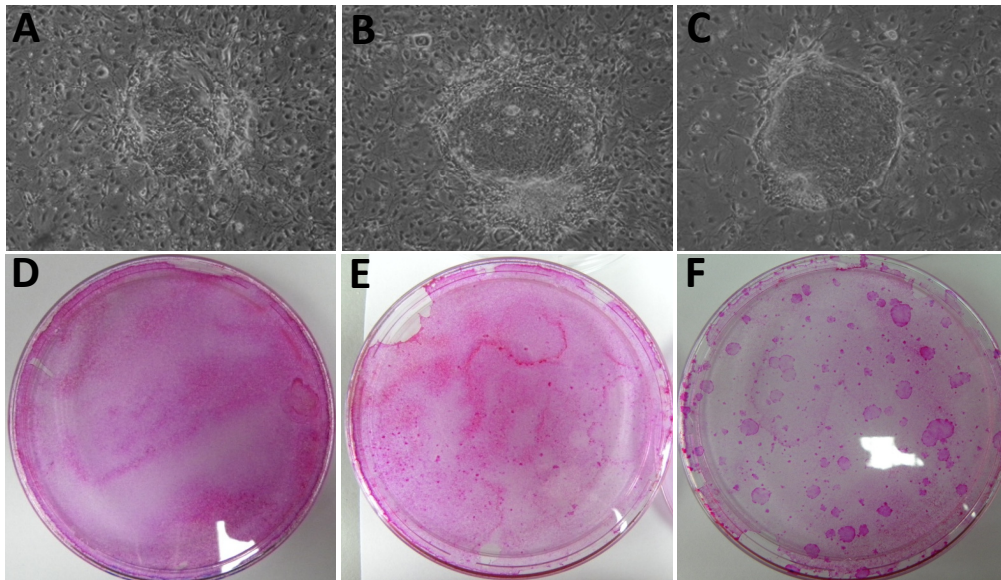


Figure 39. Clonal analysis in LPCs established from explants and cell suspensions. (A) Paraclone obtained from a LPC derived from an explant. (B) Paraclone and (C) meroclone obtained from LPCs generated from cell suspensions. (D) Colonies formed from a paraclone found in a LPC established from explants. Colonies formed from a (E) paraclone and from a (F) meroclone found in a LPC established from the cell suspension technique. The paraclones from LPCs generated from explants originated no colonies. However, the paraclones from LPCs derived from cell suspensions enabled the generation of new colonies, although all of them were terminal. (A, B, and C) Representative phase contrast microscopy images (4X). (D, E, and F) Representative images of colonies fixed and stained with rhodamine B. Abbreviations: LPC, limbal primary culture.

► In summary, under our culture conditions, the LPCs established from cell suspensions had more LESCs and transient cell characteristics than when derived from explant cultures (Table 12).

Table 12. Characteristics of limbal primary cultures (LPCs) generated from two different cell isolation techniques: explant and cell suspensions.

Characteristics	Explants	Cell suspensions	Advantage
Confluent LPCs	40%	94%	Cell suspension
Time for confluence (days)	20	13	Cell suspension
Number of cells in confluent LPCs	175 000	285 000	Cell suspension
Cell viability	94%	94%	Similar
Cell morphology and size (µm)	45x28, cuboidal	28x18, cuboidal	Cell suspension
Presence of defined nucleoli, lysosomes, intermediate filaments, desmosomes, and microvilli	Yes	Yes	Similar
LESC marker expression	Minor or similar	Major or similar	Cell suspension
Corneal epithelial marker expression	Minor or similar	Major or similar	Explant
Presence of endothelial cell, melanocyte, and dendritic cell marker expression	No	No	Similar
Fibroblast marker expression	Major	Minor	Cell suspension
Proliferative cells	65%	56%	Similar
CFE	1%	8%	Cell suspension
Presence of:			
• Holoclones	No	No	Cell suspension
• Meroclones	No	10%	
• Paraclones	100%	90%	

CFE: Colony forming efficiency.

DISCUSSION

In this work, we have shown that it is possible to optimize the current techniques used for *in vitro* LESC culture with the final aim of improving the clinical outcome of LESC transplantation to the ocular surface that has been damaged due to LSCD. First, we have established and reported the development of a protocol to obtain consecutive successful LPCs from single 1-4 mm² cadaveric limbal samples.³⁵ The resulting LPCs preserved cell morphology and maintained the LESC phenotype through LPC3-LPC4. In subsequent passages the cells became larger and more elongated. This morphological change coincided with decreased LESC marker expression and with a trend to increased protein expression of the fibroblast marker S100A4. In a similar study, Li *et al.* cultured and passaged human limbal explants three consecutive times. They also found a decline in limbal epithelial cell outgrowth and an increase in cell size during successive limbal explant passages. However, cell outgrowth was not characterized.¹⁵⁹ Recently, Selver *et al.* characterized the outgrowth obtained during three consecutive limbal explant passages, but only the ABCG2 marker was analysed.¹⁶⁰ To investigate the feasibility of increasing the number of available LPCs from a single limbal explant, we considered it necessary to characterize them exhaustively.

We initially expanded 190 cadaveric limbal explants, of which 32.5% reached a confluent state. This relative low expansion index is explained by the used of cadaveric instead of fresh tissue, as well as by the advanced age of donors. James *et al.* and Notara *et al.* found a decreasing trend in growth potential of limbal tissues with increasing donor age,^{170,171} and Vemuganti *et al.* showed that the growth potential of fresh tissues was much higher compared to cadaveric tissues.¹⁷²

To overcome the problem of the high age of tissue donors for research, we established a personally modified culture medium. The composition of culture medium included components that increase cell proliferation such as FBS,¹⁴⁵ insulin, EGF,¹⁷⁴ and hydrocortisone.¹⁷⁵ It also included components such as transferrin,¹⁷⁶ selenium,¹⁷⁷ and DMSO¹⁵¹ to reduce cell damage caused by oxygen radicals. Another important component of this culture medium was cholera toxin that increases cell proliferation in keratinocytes, especially those derived from advanced age donors, and allows growth through serial cell transfers.^{149,183} We used a culture medium with a relatively high concentration of cholera-toxin and found that limbal cell expansion from single limbal explants for six consecutive passages is possible. For hypothetical clinical purposes, it is likely that a lower concentration of cholera toxin will be sufficient because the age of the donors is usually less than 60 years.

To study changes in the cell population of successive LPCs, we characterized them phenotypically by real time RT-PCR and immunofluorescence. There are no definitive markers for the identification of LESC, but rather the presence and absence of a combination of characteristics. Thus to distinguish LESC and transitional cell populations in

the limbal niche from the fully differentiated cell population present in the cornea, we used several morphological features. These included the combination of small cell size and the positive or negative expression of specific genes and proteins (reviewed in¹⁸⁵⁻¹⁸⁷). Many investigators have reported that K3 and K12 are specifically expressed in corneal epithelial cells, defining them as markers of corneal epithelial differentiation.^{42,43} On the other hand, the expression of K14, K15, ABCG2, and p63 markers have been described as higher in the limbal basal epithelial cell layer than in the central corneal epithelium.^{79-81,188,231} In this work, our results are consistent with this. However, some authors have reported the presence of K5/K14 protein pair in the basal cells of both limbal and corneal rabbit epithelia¹⁸⁹ and ABCG2 protein in the stem cells of the limbal stroma.⁶³ Our results are also consistent with this. On the other hand, S100A4 has been widely established as a specific marker of fibroblasts and of the epithelial-mesenchymal transition phenomenon.⁶¹ We found low expression of this marker in limbal and corneal stromal tissues, but abundant expression in limbal fibroblast primary cultures, as expected.

In LPC characterization, real time RT-PCR confirmed a considerable expression of both LESC and corneal markers from LPC0 through LPC2 and lower levels in the subsequent cultures. One exception was *ABCG2*, for which the expression in LPC1-LPC2 was similar to that in LPC5-LPC6. In contrast, the percentage of cells positive for corneal epithelial cell markers K3 and K12 detected by immunofluorescence-microscopy was high in the majority of LPCs. This apparent discrepancy can be explained because real time RT-PCR analyzes the relative amount of mRNA while immunofluorescence-microscopy analyzes the percentage of positive cells and not the amount of protein expressed in each sample. Therefore the results of real time RT-PCR cannot be directly compared with the results of immunofluorescence assays, as already pointed out by other authors.¹⁹⁰

The percentage of cells that expressed LESC protein markers K14, K15, and p63 decreased from LPC0 to LPC2, while the percentage of cells that expressed corneal epithelial protein markers increased in these LPCs. However, the percent changes of positive cells were not significant between LPC0 and LPC2 for any of the LESC and corneal markers except for p63 α . On the other hand, a low percentage of cells positive for S100A4 were detected in LPC0-LPC2, suggesting the presence of a small population of fibroblast or mesenchymal cells⁶¹ that may be interacting with the epithelial cells in order to preserve the LESC properties.¹⁹¹ Conversely, the percentage of positive cells for S100A4 was very high from LPC4 to LPC6. This suggests that limbal epithelial cells that migrated from limbal explants to the culture plate maintained the characteristics of LESC in LPC0-LPC2, but lost these characteristics in LPC3. These results are consistent with those of Li *et al.*, who suggested that LESC indeed migrated from the limbal explant to the substratum during the *in vitro*

expansion, but the percentage of progenitor cells, determined by clonogenicity assays, progressively declined in the LPCs after each limbal explant passage due to intrastromal invasion by LESC^s.¹⁵⁹ These results, together with the changes from epithelial-like morphology in LPC0-LPC3 to intermediate epithelial-elongated morphology in LPC4, and then finally to elongated morphology in LPC6, indicate a change in the LPC cell population to a more differentiated fibroblast-like population. This is in accordance with observations by Li *et al.* and with the “LESC cores” remaining in their natural niche after LE cultivation.^{159,160} These core LESC^s support the outward migrating progeny. Both authors observed that the number of epithelial cell layers on the LE surface progressively decreased after each passage, a finding that is consistent with our results. In addition, Li *et al.* observed that the basement membrane components were partially dissolved and broken down in the limbus and peripheral cornea after 2 weeks of limbal explant culture.¹⁵⁹ Previously, Kawakita *et al.* showed that LESC^s invade the limbal stroma in cultured rabbit limbal explants.¹⁹² In the same way, Li *et al.* demonstrated two fates for LESC^s in human LEs during cultivation. The first one was the migration of LESC^s from the explants to the amniotic membrane, and the second one was an intrastromal invasion.¹⁵⁹ Recently, Tan *et al.* reported that intrastromal invasion by LESC^s in human limbal explants is a universal phenomenon as it occurs under different culture conditions.¹⁹³

We postulate that the presence of undifferentiated epithelial cells in confluent LPC0-LPC2 cultures is explained by the first fate, migration of LESC^s from the LE onto the polystyrene-substratum. This fate could be performed by the “LESC cores” reported by Selver *et al.*¹⁶⁰ The second fate, migration of LESC^s into the stroma, would make them unavailable for colonization of the culture substratum in LPC4-LPC6. For these cultures, limbal fibroblasts and/or mesenchymal cells could migrate from the limbal stroma onto the culture dish to establish primary cultures of cells with elongate morphology that express S100A4, K3, K12, and ABCG2 proteins. In agreement with Selver *et al.* we observed a gradual loss of morphological features and size in limbal explants during consecutive passages, suggesting a stromal degradation that matched the frequent contamination of the LPCs by fibroblasts.¹⁶⁰

Mesenchymal stem cells are present underneath the limbal basement membrane⁹² and a recent report showed that K3/K12 are expressed in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells.¹⁹⁴ In addition, another recent report showed that human mesenchymal stem cells from adult adipose tissue expressed a moderate amount of K3 and K12 markers.¹⁹⁰ Probably, human limbal mesenchymal stem cells also express K3 and K12. Although further research will be necessary to confirm this in human cells, we believe that some of the positive cells for K3 and K12 found in our LPCs may be of mesenchymal origin. ABCG2, a marker for limbal epithelial cells, was highly expressed in the first LPCs. This is probably due to the presence of

LESCs, also shown by the presence of cells positive for K14, K15, and p63 α . However, ABCG2 protein was also detected in LPCs with elongated cells in LPC4. Du *et al.* reported that, similar to other adult tissues, stem cells in the corneal and limbal stromas express the ABCG2 marker.⁶³ This likely explains the presence of ABCG2 protein in our LPC4.

We showed that LPCs from LPC0 through LPC2 were composed of a heterogeneous cell population, with cells positive for LESC-specific markers K14, K15, ABCG2, and p63, for central corneal epithelial specific markers K3 and K12, and for fibroblast marker S100A4. This indicates a mixture of undifferentiated LESCs, differentiated epithelial cells, and some fibroblasts. From LPC4, the presence of differentiated epithelial cells and fibroblast increased, while the presence of LESCs significantly decreased. Therefore, LPC0-LPC2 could be used as similar LPC standards for basic research to increase the number of available human LPCs, to optimize *in vitro* LESCs expansion, and to further the understanding of LESC biology. Additionally, our results suggest that by using a carrier, this protocol potentially could be adapted for application in clinical practice. Usually, human amniotic membrane, fibrin and/or mice-embryonic-3T3/J2 fibroblasts are used as support for *in vitro* LESC expansion.¹³⁴ However; human amniotic membrane is an expensive tissue difficult to obtain due to its human origin, thus limiting its use to those studies where it is indispensable. On the other hand, we support the idea that the use of compounds from animal-origin could compromise the potential clinic application of this protocol and according, we did not use mice-embryonic 3T3/J2 fibroblasts as cell substratum.^{137,254,255}

In vitro expanded LESC transplantation can be hampered by culture failure, graft transport problems, surgical mishaps, or by postoperative complications 1 - 6 weeks after placement on the recipient's ocular surface. Any of these complications could result in early graft failure.¹³³ With the establishment of successive LPCs from a single limbal explant, these issues could be quickly resolved with a new transplant of expanded autologous LESCs from the same initial biopsy. This would avoid the necessity of taking another biopsy or the use of allogeneic tissue with the implied risk of rejection. This procedure could be used to originate an expanded autologous LESC reserve for each patient (Figure 40). Additionally, LPCs not needed for transplantation could be analyzed. The results could then be correlated with the success or failure of the clinical application¹³³ resulting in a better knowledge base from which future decisions regarding the likelihood of success could be made.

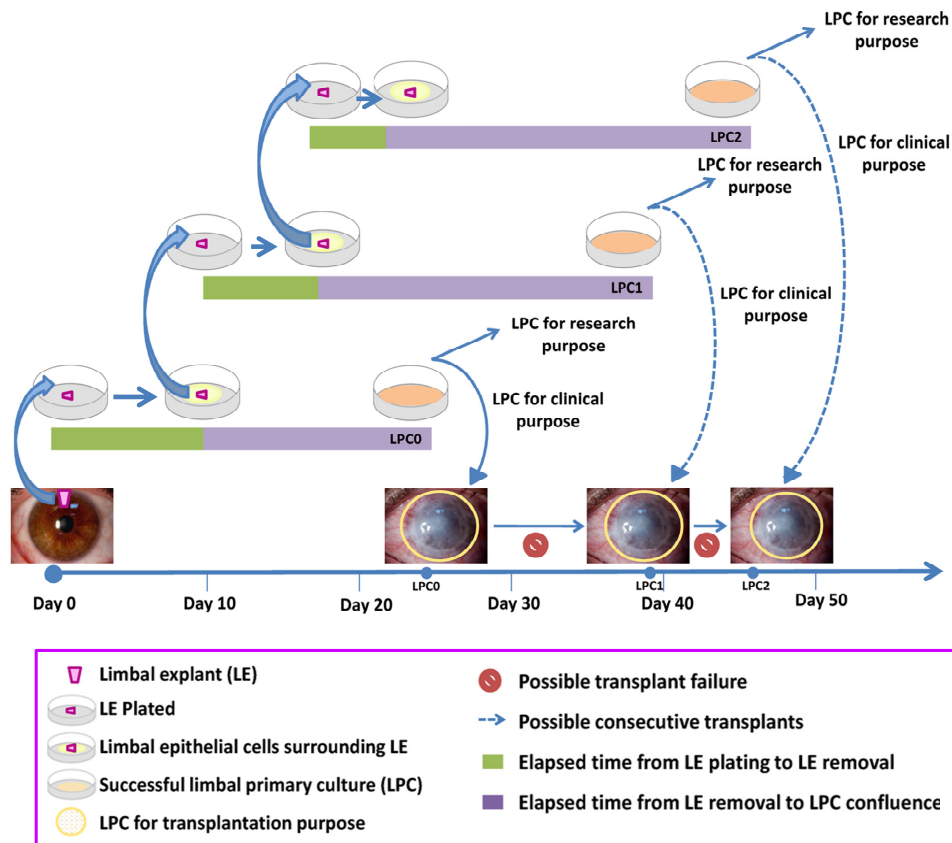


Figure 40. Potential uses for successful consecutive LPCs. One LE of 1-4 mm² can be successfully expanded maintaining epithelial morphology and LESC phenotype up to three consecutive times (LPC0, LPC1, and LPC2). These can be used to increase the number of available human LPCs for basic research. In addition, this method could also be adapted to expand LESC*s in vitro* for transplantation. *In vitro* expanded LESC transplantation can be hampered by failure in the LESC culture, graft transport, surgery, or by early (1-6 weeks) postoperative complications on the recipient's ocular surface. These complications could be quickly solved with a new transplant of expanded LESC*s* from the same initial biopsy. This procedure could be used to originate a reserve of expanded LESC*s* for each patient. If not needed for the patient, the reserve LPCs could be analyzed for properties that correlate with clinical results. Abbreviations: LE, limbal explant; LPC, limbal primary culture; LESC*s*, limbal epithelial stem cells.

At present, *in vitro* cultured LESC transplantation is the treatment of choice for patients suffering from ocular surface failure due to LSCD.¹³¹⁻¹³³ However, the culture media currently used for LESC expansion often contains animal and/or other potentially harmful supplements that could induce zoonosis and/or side effects, compromising the clinical application of the LPCs obtained. To overcome these limitations, we propose a new culture medium, IOBA-HS, that is devoid of animal serum and other potentially harmful supplements. In addition, this culture medium enables the culturing of two similar biosafe LPCs from the same limbal tissue. Both LPCs could potentially be used, by using a cell carrier, in clinical practice avoiding side effects, simplifying the culture process, and increasing the number of possible transplants.

A similar culture medium was recently reported by Stasi *et al.*¹⁴¹ They showed that it allowed culturing of LESC *in vitro* using fibroblasts as support for the epithelial cells. However until now, a culture medium without animal serum and other potentially harmful components has not been used for consecutive expansion of limbal explants. In addition, we tested the ability of IOBA-HS culture medium to support LESC culture without a fibroblast substratum.

The use of cholera toxin potentially enables the transmission of cholera to a patient, though the possibility is remote.¹⁴⁶ Here, we replaced cholera toxin by isoproterenol, a component that increases *in vitro* keratinocyte proliferation by raising the intracellular concentration of cyclic AMP, as does cholera toxin, through activation of adenylate cyclase.^{138,139,149} However, the cell effect of isoproterenol is quickly reversed while the cholera toxin exerts an irreversible action on the cyclase.^{149,202} To supplement the action of isoproterenol, we added triiodothyronine and adenine to the IOBA-HS culture medium.^{138,139,141,175}

DMSO can induce low viability and high levels of apoptosis in cultured corneal epithelial cells,¹⁵¹ as well as side effects when used in clinical applications.^{153,220} Therefore, we replaced DMSO in our modified culture medium with transferrin and selenium,^{176,177} increasing the biological safety while not compromising the balance of oxidative stress.

Animal blood serum can induce zoonotic disease transmission. Previously, *in vitro* investigations and clinical trials have shown that FBS can be replaced by HS while maintaining the morphology, proliferative, and differentiation stages of LPC cells,^{132,225} as well as the clinical outcomes of LESC transplantation.¹³² Therefore, we replaced the FBS in IOBA-FBS with HS, to create the IOBA-HS composition. In this final culture medium, we have removed the putative harmful substances cholera toxin, DMSO, and FBS and replaced them with harmless components that have similar mechanisms of action. With this medium, LPCs are adequately supported while the biological safety has been improved.

For the three culture media that we tested, the human limbal explants exhibited a relatively low performance as expressed by the percentage of LPCs that reached the confluent stage. For CnT20, IOBA-FBS, and IOBA-HS, the percentage of LPCs reaching confluence was 18.9%, 25.9%, and 29.0%, respectively. Vemuganti *et al.* (2004) showed that the growth potential of fresh tissues was up to 100%, compared to the 51% in the cadaveric tissues. The age of their cadaveric donors was 63.7 ± 16.8 years old,¹⁷² while in our study the mean donor age was 80.8 ± 2.4 years. Therefore, the low percentage of cultures that reached confluence was most likely due to the advanced age and cadaveric origin of the tissue donors. In addition, other authors reported the impact of age in donated limbal tissues.¹⁷¹ In addition, the time to reach confluence by LPCs cultured with CnT20 or IOBA-FBS was higher in our experiments than when limbal explants were cultivated by other groups using CnT20 or

culture media supplemented with FBS.^{162,226} However, in those studies two limbal explants were plated together, providing two different growth points in the same well, and the tissue donor age and the time of tissue storage before explant cultivation were lower than in our experiments. All of these factors can affect the time to obtain confluent LPCs. On the other hand, the percentage of confluent LPCs, as well as the necessary time to reach this stage, was mildly higher with IOBA-HS. This fact could be explained by a putative greater presence of cells with a slow cell cycle in LPCs cultured with IOBA-HS, a typical characteristic of LESC.⁶⁷

LPC cells showed typical epithelial cell morphology for all three of the tested culture media, expressing specific epithelial markers such as keratins⁴⁰ along with the absence of endothelial (PECAM),²²⁷ melanocytic (MART-1),⁷⁰ and dendritic cell (CD11C) markers.²²⁸ The results suggest that these LPCs were mainly composed of epithelial cells. On the other hand, LPC cells obtained with the three culture media expressed the S100A4 marker⁶¹ and occasionally they had an elongated morphology, both typical characteristics of fibroblasts. In a similar way, our research group, as well as others, have reported sporadic fibroblast growth in LPCs obtained with other culture media.^{135,225} Therefore, we believe that the composition of the new IOBA-HS culture medium does not especially promote the growth of fibroblasts.

Until now, no marker has been definitively associated with LESC. However, the presence of LESC-associated markers ABCG2, p63, K14, and K15, together with the absence of corneal epithelial-differentiation markers K3 and K12, can be used to identify putative LESC.^{45,187,231} We detected that only LPCs incubated with IOBA-HS expressed all of the LESC specific proteins analyzed, while the specific corneal epithelial differentiated proteins K13 and K12 were expressed with all three culture media. In addition, we observed that the percentage of cells positive for the LESC marker proteins ABCG2, p63, and K14 was slightly greater in LPCs cultured with IOBA-HS than with CnT20 or IOBA-FBS. In contrast, the relative mRNA expression of these markers was higher when CnT20 was used. Similar results were detected for the K3 marker. While the immunofluorescence and real time RT-PCR data do not seem to be consistent with one another, they cannot be directly compared because the absolute amounts of mRNA or protein were not analyzed with the techniques employed. Similar results have been previously reported.¹³⁵ Additionally, a putative post-transcriptional regulation that blocks translation of these genes in LPCs cultured with CnT20 could also explain the results.

K15 protein was expressed in a low percentage of limbal epithelial cells in culture, consistent with the relatively small percentage of LESC that are presents in the healthy limbal niche.⁶⁷ Despite this, K15 protein and mRNA were the only markers expressed in significantly higher levels in LPCs incubated with IOBA-HS, suggesting that IOBA-HS could promote LESC proliferation.

To determine if FBS and HS could induce different effects, IOBA-FBS and IOBA-HS culture media were compared. Nakamura *et al.* (2006) showed that human limbal epithelial cells cultivated with cholera toxin-supplemented culture medium plus FBS or HS had similar *in vitro* characteristic.²²⁵ Consistent with these results, we observed that the expression of S100A4, ABCG2, p63, K14, K3, and K12 markers was similar in LPCs incubated with IOBA-FBS or IOBA-HS. This suggests that FBS and HS produce similar *in vitro* actions when a cholera toxin- and DMSO-free culture medium was used. However, the expression of K15 protein was significantly higher when HS was used, suggesting that HS could better maintain the undifferentiated cell stage of LESC than FBS. In a similar way, Takagi *et al.* (2011) analyzed the colony forming efficiency of oral epithelial cells cultured in a medium supplemented with isoproterenol plus HS or FBS. They showed that cholera toxin can be replaced by isoproterenol in the culture medium for *in vitro* cultivation of epithelial cells, especially when HS is added.¹³⁸ Recently, Stasi *et al.* compared two culture media that were identical except for presence of FBS and cholera toxin in one and HS and isoproterenol in the other. They showed that the HS-isoproterenol culture medium produced a higher percentage of holoclones than the other culture medium, supporting our findings for the combination of HS and isoproterenol for cultured LESC.³⁸

Due to the good outcomes obtained with IOBA-HS culture medium and the benefits that it provides over CnT20 and IOBA-FBS, we investigated the feasibility of culturing the same limbal explants consecutively with this culture medium. In similar studies, limbal explants were repeatedly cultured,^{135,159,160} however the culture media in those studies were supplemented with cholera toxin, DMSO, and/or FBS.

We showed that a single limbal explant can be cultured up to three consecutive times (LPC0-LPC3) with IOBA-HS culture medium, though only LPC0 and LPC1 cell populations maintained the LESC phenotype. The phenotypic LPC characterization confirmed the protein and mRNA expression of all analyzed LESC and corneal markers in LPC0 and LPC1, except for protein p63, which was only detected in LPC0. Except for K14 and K12 protein expression, changes in the expression of LESC and corneal markers were detected in LPC2. The percentage of p63-, K15-, and K3-positive cells and the relative mRNA expression of these markers decreased in LPC2. These results were consistent with the changes from epithelial-like morphology in LP0-LPC1 to elongated morphology in LPC2, suggesting a change in the LPC cell population. The markers suggest the presence of mixed undifferentiated and differentiated limbal epithelial cells in LPC0-LPC1 that then change to a limbal fibroblast-like cell population in LPC2. These results were confirmed by the increase of cells positive for S100A4-fibroblast protein marker from LPC0 to LPC2.

Like S100A4, the percentage of cells positive for ABCG2 and the relative expression of ABCG2 mRNA increased from LPC0 to LPC2. The ABCG2-positive cells in LPC0 and LPC1 were probably due to the presence of LESC, which is consistent with the expression of p63, K14, and K15. However, ABCG2 is also expressed by limbal stromal cells.⁶³ This likely explains the high expression of this marker in LPC2 cells with elongated morphology and the higher percentage of S100A4-positive cells.¹³⁵

The presence of differentiated and undifferentiated epithelial cells in the confluent LPC0 and LPC1 could be explained by the migration of some LESC from the explant onto the substratum. According to some authors,^{159,192,193} the migration of LESC into the stroma would make them unable to colonize the culture substratum in the last limbal explant passage. In LPC2, limbal fibroblasts and/or mesenchymal cells could migrate from the limbal stroma onto the culture dish to establish LPCs composed of cells with elongated morphology and the absence of p63 and K15 protein markers. A similar phenomenon was shown when a culture medium with cholera toxin, DMSO, and FBS was used (Objective 1); however, the change in the cell population was detected in LPC3-LPC4.¹³⁵ Several authors have reported that *in vitro* cultured keratinocytes cannot be subcultured without cholera toxin, whereas keratinocytes subcultivation was possible in the presence of cholera toxin.^{149,183} Therefore, our results suggest that the “early” change observed in the LPC cell population could be due to the absence of cholera toxin in the IOBA-HS culture medium. However, some of the other components might also be involved in the different outcome of LPCs. Further experiments are required to determine the implication of each supplement in the behavior of the LPCs.

For the first time, we have demonstrated that a culture medium, IOBA-HS, that lacks non-human animal serum and other potentially harmful compounds could be used for the *in vitro* expansion of two high quality, biosafe LPCs obtained from the same limbal explant. Therefore, the resulting LPCs, if used with a cell carrier, could serve as reservoirs of autologous, *in vitro* cultured, biosafe LESC for transplantations in patients with LSCD. These reservoirs could be used for cultured LESC transplantations that are hampered by culture failure, graft transport, surgical mishaps, or early postoperative complications (Figure 41).¹³³

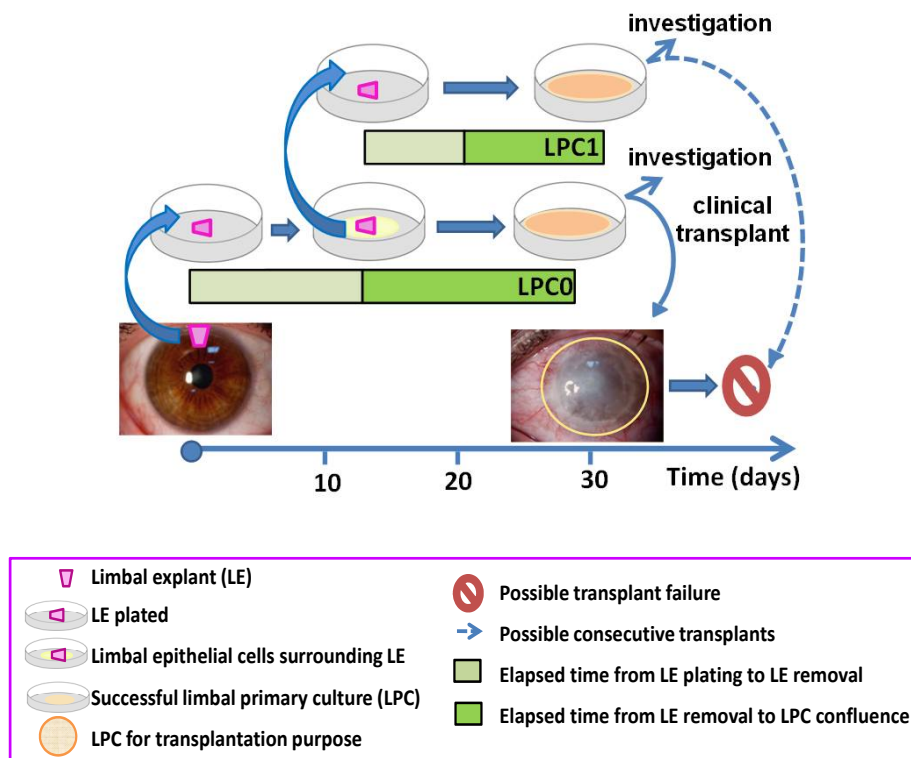


Figure 41. Potential uses for successful consecutive LPCs cultured with IOBA-HS culture medium. One LE of 1-2 mm² can be successfully expanded while maintaining epithelial morphology and LESC phenotype for two consecutive cultures, LPC0 and LPC1. These can be used to increase the number of available human LPCs for basic research. In addition, this method could also be adapted to expand LESC*s in vitro* for transplantation. *In vitro* expanded LESC transplantation can be hampered by failure in the LESC culture, graft transport, surgery, or by early (1-6 weeks) postoperative complications on the recipient's ocular surface. These complications could be quickly solved with a new transplant of expanded LESC*s* from the same initial biopsy. This procedure could be used to originate a reserve of expanded LESC*s* for each patient. If not needed for the patient, the reserve LPCs could be analyzed for properties that correlate with clinical results. Abbreviations: LE, limbal explant; LPC, limbal primary culture; LESC*s*, limbal epithelial stem cells.

To address the third objective of this doctoral thesis, we compared the two most commonly used techniques for the isolation of epithelial cells from the limbal niche: limbal explants and cell suspensions.¹²⁴ Currently, the theoretical advantages and disadvantages of either technique are known and the main differences between them have been studied by several research groups.^{161-163,229,249} However, up to now, no significant differences between them have been reported. It should be pointed out that functional analyses of cell clonogenicity have never been made to compare the performance of both cell isolation techniques. Here, we compared both explant and cell suspension techniques using the “biosafe IOBA-HS” culture medium. The composition of this culture medium is similar to that of IOBA-HS, but with

some improvements. First, the concentration of insulin, EGF, and hydrocortisone were modified to optimize their action inside the cells, and transferrin and selenite were removed. Second, all of the components of this culture medium were of human, recombinant, and/or chemically synthesized origins. Therefore, the biosafe IOBA-HS culture medium is completely lacking animal and potentially harmful components for human use.

To achieve this aim, 208 LPCs were established by outgrowth from limbal explants and 61 were established from limbal cell suspensions. An average of nine explants from each limbal half-ring was plated, and 40% (3-4 LPCs per half-ring) reached confluence. However, only an average of two cell suspensions could be cultured from the same quantity of limbal tissue (limbal half-ring). In this case, the percentage of LPCs that reached confluence was 95% (2 LPCs). Therefore, an average of four confluent LPCs was established from limbal half-ring explants while two were established from cell suspensions. The low percentage of cultures that reached confluence when they were established from explants was most likely due to the advanced age and the cadaveric origin of the tissue donors, as we pointed out above.¹⁷⁰⁻¹⁷² These limbal tissue characteristics also affected the LPCs established from cell suspensions; thus, the number of the LPCs was dependent upon the number of cells isolated from limbal tissues, that was dependent on the quality of tissues.

The percentage of confluent LPCs obtained from explants could be affected by the specific limbal ring region where the explants were taken. Utheim *et al.* reported that LESC are mainly located in the superior and the inferior limbal ring area.¹⁷³ We cultured explants from superior, inferior, nasal, and temporal limbal regions (from the whole limbal ring). Recently, our research group reported that when limbal explants exclusively from the superior area of the limbal ring were cultured on plastic dishes with biosafe IOBA-HS, the percentage of confluent LPCs increased to 58%.¹³⁶ These data suggest that only the limbal explants taken from the superior and the inferior regions are more likely to generate successful LPCs. However, these results cannot be strictly compared with the outcomes shown here, because the areas of cultivation that the cells had to cover to achieve confluence were different. To confirm this hypothesis it will be necessary to perform more experiments.

The time to reach confluence was significantly higher when the LPCs were obtained from explants, 19 days, than from cell suspensions, 13 days. This is consistent with the observations made by Kim *et al.*, who showed that LPCs from explants needed 14-21 days to reach confluence, while those from cell suspensions required only 10-14 days.¹⁶² However in their study, two limbal explants were plated together, providing two different growth points in the same well, and the cell suspensions were established on 3T3/J2-feeder layers.¹⁶² In addition, the tissue donors' age and the time of tissues storage before cell cultivation were lower than those of our experiments. All these factors can affect the time needed to obtain

confluent LPCs. Nevertheless, we did not see any negative effect of these factors in the elapsed time from the plating to the achievement of confluence for either explant or suspension cultures. The culture medium used by Kim *et al.* to perform these experiments was supplemented with FBS, cholera toxin, and DMSO. Therefore, we think that our biosafe IOBA-HS culture medium could improve limbal epithelial cell growth from explants and cell suspensions. More experiments will be necessary to test this aspect.

LPCs established following the explant protocol needed more time to reach confluence than those obtained from cell suspensions. This could be explained by a putative greater presence of cells with a slow cell cycle in LPCs obtained from explants, a typical characteristic of LESC⁶⁷. We think that this difference is correlated with the time required for cells to migrate from the limbal explants to the plastic plates (9 days), time that is not necessary for the cell suspension protocol. In addition, Kim *et al.* showed that the number of cells with slow cell cycle was higher in LPCs obtained from cell suspensions than from explants.¹⁶² The time to reach confluence in LPCs established from cell suspensions is directly proportional to the number of cells plated. We first tested different cell densities to establish the most appropriate culture conditions (data not shown). Based on these experiments, we decided to seed 15,000 cells/cm², which is consistent with previous reports.^{167,250}

The number of cells present in confluent LPCs was higher in the ones generated from cell suspensions. In agreement with this, the size of the cells was significantly smaller in the confluent LPCs established through cell suspensions than those obtained from explants. This is consistent with a report by Kim *et al.* who found that LPC cells from cell suspensions were smaller than those derived from explants,¹⁶² suggesting a higher number of LESC⁶⁷ in these LPCs.^{45,251,252}

Cell ultrastructure was analyzed by transmission electron microscopy. Through this technique, Schlötzer-Schrehardt *et al.* observed groups of small, roundish, densely packed cells at the bottom of the epithelial papillae forming the limbal palisades of Vogt. Within these clusters, two different cell types could be distinguished: small and primitive appearing putative stem cells, and surrounding them, large melanin-containing early progenitor cells thought to be putative transitional amplified cells. The putative stem cells were characterized by a high nuclear-cytoplasmic ratio, nuclei without distinct nucleoli, sparse cytoplasm containing melanin granules, few mitochondria, ribosomes, few intermediate filaments; hemidesmosomes, and large intercellular junctions. In contrast, the putative transitional amplified cells had nuclei with distinct nucleoli, prominent melanin granules, tonofilament bundles, cell processes interdigitating with the underlying matrix, and numerous desmosomes.⁴⁵

We observed the similarity of cell morphology in LPCs derived from explants and from cell suspensions. The cells had cytoplasm containing few mitochondria and ribosomes, both typical characteristics of undifferentiated cells. However, the cells had nuclei with distinct nucleoli, high quantity of intermediate filaments, and desmosomes, which are common features of differentiated cells.⁴⁵ These characteristics suggest that the LPCs generated from explants and from cell suspension contained a cell population rich in transient cells.⁴⁵ On the other hand, Koizumi *et al.* showed that the stratified LPCs established from explants on amniotic membranes had bigger intercellular spaces than when the LPCs were obtained from cell suspensions, a fact that we also observed.¹⁶¹ In addition, primary lysosomes were observed in LPC cells obtained by both isolation techniques. This could be due to the presence of some factors in the culture conditions that were inducing cell stress.

LPC cells had a typical epithelial cell morphology when they were established through both cell isolation techniques, expressing specific epithelial cell markers such as keratins⁴⁰ along with the absence of endothelial (PECAM),²²⁷ melanocyte (MART-1),⁷⁰ and dendritic cell (CD11C) markers.^{228,49} Our results suggest that these LPCs were mainly composed of epithelial cells. On the other hand, LPCs obtained through both cell isolation techniques expressed the S100A4 marker, specific for fibroblasts.⁶¹ This marker was detected in greater amounts in LPCs generated from explants, probably because fibroblasts could migrate from the stroma present in the explants to the substratum during cultivation.

The LPCs established from explants and cell suspensions were characterized by real time RT-PCR and immunofluorescence microscopy. LESC and corneal epithelial cell markers were analyzed. We observed that the relative mRNA expression of LESC markers *K14* and *ABCG2* was similar in LPCs obtained through both techniques, but it was higher for *K15* in LPCs established from cell suspensions. Only the relative expression of *p63 α* mRNA was higher in LPCs generated from explants. In addition, the percentage of cells that expressed the LESC markers *K14*, *K15*, *ABCG2*, and *p63 α* was higher in LPCs obtained through limbal cell suspensions than from explants. These results suggest that the LPCs originated from cell suspensions have a greater number of cells with the LESC phenotype than those established from explants. Consistent with our results, Zhang *et al.* showed that rabbit limbal cells cultured from cell suspensions expressed more deltaNp63 protein than LPCs established from limbal explants.¹⁶³ However, Kim *et al.* reported that the protein expression of p63 was similar in human LPCs obtained by both cell isolation techniques.¹⁶² These contradictory results could be due to the different culture conditions used in each study. In addition, Kim *et al.* analyzed all of the p63 protein isoforms,¹⁶² while Zhang *et al.* and our research group specifically studied the expression of deltaNp63¹⁶³ and p63 α isoforms, respectively.

Koizumi *et al.* showed that corneal epithelial cell markers K3 and K12 were similarly expressed in LPCs obtained from explants and cell suspensions when they were both established on amniotic membrane.^{161,256} This fact was also confirmed by Kim *et al.* for the K3 marker.¹⁶² Accordingly, we have not observed significant differences in either the relative mRNA expression or in the percentage of cells positive for the corneal epithelial cell markers K3 and K12 between the LPCs established from explants and cell suspensions. This confirms the presence of differentiated cells when both cell isolation techniques were used.

The results obtained during the cell characterization suggest that LPCs established from both isolation techniques had a heterogeneous cell population with differentiated and undifferentiated cells. In addition, looking at the percentage of cells that expressed LESC and corneal epithelial cells proteins, it is clear that, at least in the LPC established from cell suspensions, there were cells expressing both types of cell markers at the same time. These results suggest the presence of transient cells, in accordance with the results obtained by electron microscopy.

To analyze the cell clonogenicity in the LPCs established from explants and cell suspensions using the bio-safe IOBA-HS culture medium, we studied the CFE and the cell capacity to form holoclones, meroclones, and paraclones.⁸⁷ We observed that the CFE was significantly higher in LPCs established from cell suspensions (8%) than from explants (1%). These results are in agreement with the higher expression of LESC markers in LPCs obtained from cell suspensions, due to the fact that LESCs have more proliferative and clonogenicity capacity than differentiated corneal epithelial cells.^{76,86} The CFE in our cultures, mainly when established from cell suspensions, was similar to that in LPCs expanded on fibroblast 3T3/J2 with a culture medium supplemented with FBS and cholera toxin.^{167,250} Therefore, it is quite possible that our cell expansion protocol favors the maintenance of cell clonogenicity, especially when LPCs are established using the cell suspension technique.

We also observed that all colonies from confluent LPCs established through explants were paraclones, while this percentage decreased to 90% when the LPCs were obtained from cell suspensions. The percentage of meroclones established from LPCs obtained from cell suspension was 10%, while none of the culture conditions studied preserved holoclone capacities. Pellegrini *et al.* showed that the majority of the clones, 70%, established from LPCs cultured from cell suspensions were classified as meroclones, while holoclones and paraclones constituted 20% and 10%, respectively.⁸⁶ Notara *et al.* also reported a high percentage of meroclones from LPCs obtained from cell suspensions.¹⁶⁷ However, both studies used limbal tissues from young donors and 3T3/J2 as feeders. We think that the use of young tissues could have increased the number of holoclones grown, due to several authors have reported an increased trend in growth potential of limbal tissues with decreasing

donor age.^{170,170-172} In addition, we think that the use of 3T3/J2 as feeder layer could have increased the number of holoclones grown because fibroblasts stimulate the maintenance of undifferentiated cells *in vitro*.^{97,191} These results highlight the importance of the specific substratum used for LESC cultivation. Nevertheless, our research group supports the idea that the use of components from animal origin could compromise the potential clinical application of the different *in vitro* approaches. That is why we did not use 3T3/J2 in our experiments. Several research groups are currently studying the possibility of using human fibroblasts or mesenchymal cells as cell substrata,^{141,250,253} and our research group is at present developing a new biopolymeric substratum that could improve the clonal cell capacity of the LPCs.

Pellegrini *et al.* cultured cells only from the superior limbal region, increasing in this way the possibility of culturing LESC *in vitro*.^{171,173} Moreover, we think that the number of colonies that we subcultivated to determine holoclones, meroclones, and paraclones may be limiting our results. Pellegrini *et al.* subcultured 30 colonies from each confluent LPC, and they reported that holoclones could be found in a proportion of 1/20.⁸⁶ However, we only subcultured 10 colonies, thus decreasing considerably the possibility that a holoclone was cultured. We think that additional experiments in which more colonies are subcultivated could increase the number of holoclones found.

Our results show that LPCs obtained from cell suspensions had a mixture of differentiated and transient cells, and that the percentage of transient cells was significantly higher in LPCs established by explants. This is in accordance with the smaller cell size and the higher expression observed for K14, K15, ABCG2, and p63 α proteins in the LPCs obtained from cell suspensions. Therefore, we have demonstrated that under our culture conditions, the LPCs established from cell suspensions have more LESC and transient cell phenotypes than when the LPCs are obtained from explants.

CONCLUSIONS

1. We have designed an efficient protocol to establish several similar LPCs rich in LESC from a single limbal piece. Consequently, several LPCs obtained from a single biopsy could be used for basic research to increase the number of available human LPCs, to optimize *in vitro* LESC expansion, and to further understand LESC biology.

Additionally, our results suggest that by using a carrier, this protocol could be potentially translated to a clean room, where the LPCs for clinical transplantation are prepared. By doing so, additional limbal tissue could be made available for patients suffering from LSCD syndrome. This expanded LPC could be used in case the first expanded LPC failed to actually expand correctly or failed later for other reasons (surgical failure, postsurgical complications, etc). Additionally, LPCs not needed for transplantation could be analyzed. The results could then be correlated with the success or failure of the clinical application, resulting in better knowledge from which future decisions regarding the likelihood of success could be made.

2. A newly developed culture medium that we have termed "biosafe IOBA-HS", which lacks non-human animal serum and other potentially harmful compounds, enabled *in vitro* LESC cultivation. This culture medium could be translated to a clean room to obtain biosafe LPCs for transplantation. Consequently, the risk of inducing zoonosis or side effects in transplanted patients would be significantly decreased.
3. We report that under our culture conditions the LPCs established from cell suspensions have a cell population richer in functional LESC than when the LPCs are obtained using the explant culture technique. These results suggest that in a clinical situation in which it is possible to choose between either isolation techniques from the donor limbal tissue, then the cell suspension is probably the best option.
4. We have shown that it is possible to optimize the current techniques of *in vitro* cultivation of LESC. The translation of these results to clinical practice could improve the quality and safety of LESC transplants, enabling the ocular surface affected by LSCD to be reconstructed more efficiently.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110:1001-1020.
2. Leblond CP. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat* 1981; 160:114-158.
3. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 19):2867-2875.
4. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88:287-298.
5. Alison MR, Poulos R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197:419-423.
6. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004; 37:23-34.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
8. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18:399-404.
9. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Controversies over stem cell research. *Trends Biotechnol* 2003; 21:109-112.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-676.
11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131:861-872.
12. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318:1917-1920.
13. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322:945-949.
14. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 2010; 5:418-428.
15. Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4:381-384.
16. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458:766-770.
17. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1002-1007.
18. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev* 2011; 7:703-713.
19. Liu SP, Fu RH, Huang YC, et al. Induced pluripotent stem (iPS) cell research overview. *Cell Transplant* 2011; 20:15-19.
20. Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 2006; 24:2319-2345.
21. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009; 217:144-160.

22. TILL JE. Radiation effects on the division cycle of mammalian cells in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1961; 95:911-919.
23. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010; 327:542-545.
24. Grompe M. Tissue stem cells: new tools and functional diversity. *Cell Stem Cell* 2012; 10:685-689.
25. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116:639-648.
26. Kuci S, Kuci Z, Latifi-Pupovci H, et al. Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4:107-117.
27. Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep* 2011; 12:113-122.
28. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:605-631.
29. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood* 2012; 120:2174-2181.
30. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:2879-2895.
31. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:14-20.
32. Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:825-835.
33. Duke-Elder S, Wybar KC. The anatomy of the visual system. In: *System of Ophthalmology*. Henry Kimpton, 1961; 95-131.
34. Bennett AG, Rabbetts RB. The schematic eye. In: *Clinical visual optics*. , 1998; 207-228.
35. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol* 2000; 44:367-408.
36. Peris C, Menezo JL. Anatomía y fisiología de la superficie ocular. In: *Mac Line*, 2004; 11-37.
37. Fernandez A, Moreno J, Prosper F, Garcia M, Echeveste J. [Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques]. *An Sist Sanit Navar* 2008; 31:53-69.
38. Klyce SD. Electrical profiles in the corneal epithelium. *J Physiol* 1972; 226:407-429.
39. Pajoohesh-Ganji A, Stepp MA. In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium. *Biol Cell* 2005; 97:265-276.
40. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:705-733.
41. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.
42. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103:49-62.
43. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:448-456.

44. Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004; 22:355-366.
45. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005; 81:247-264.
46. Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1829-1844.
47. Ross RS. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* 2004; 63:381-390.
48. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74:172-178.
49. Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4459-4467.
50. Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, et al. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 1999; 29:2695-2704.
51. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 2007; 85:845-860.
52. Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR. Collagens in ocular tissues. *British Journal of Ophthalmology* 1993; 77:515-524.
53. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2004; 78:503-512.
54. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* 2005; 24:S2-S11.
55. Barbaro V, Di Iorio E, Ferrari S, et al. Expression of VSX1 in human corneal keratocytes during differentiation into myofibroblasts in response to wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:5243-5250.
56. Pei Y, Reins RY, McDermott AM. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 3A1 expression by the human keratocyte and its repair phenotypes. *Exp Eye Res* 2006; 83:1063-1073.
57. Barraclough R, Dawson KJ, Rudland PS. Elongated cells derived from rat mammary cuboidal epithelial cell lines resemble cultured mesenchymal cells in their pattern of protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120:351-358.
58. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996; 21:134-140.
59. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450:191-231.
60. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:809-819.
61. Ryan DG, Taliana L, Sun L, Wei ZG, Masur SK, Lavker RM. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4255-4262.

62. Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A, et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 2010; 91:92-96.
63. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005; 23:1266-1275.
64. Marceau F, Boisjoly HM, Wagner E, Lille S, Roy R. Long-term culture and characterization of human limbal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res* 1990; 51:645-650.
65. Scheef EA, Huang Q, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. Isolation and characterization of corneal endothelial cells from wild type and thrombospondin-1 deficient mice. *Mol Vis* 2007; 13:1483-1495.
66. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:3645-3648.
67. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989; 57:201-209.
68. Baum JL. Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am J Ophthalmol* 1970; 69:669-676.
69. Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal PC, Desmet V. Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:220-225.
70. Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K. Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2005; 81:218-223.
71. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 9):1535-1542.
72. Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, et al. N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007; 25:289-296.
73. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:3515-3519.
74. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, et al. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol* 2009; 18:799-819.
75. Sun TT, Green H. Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states. *Nature* 1977; 269:489-493.
76. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:1533-1537.
77. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:2672-2679.
78. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; 229:560-561.
79. Figueira EC, Di GN, Coroneo MT, Wakefield D. The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:144-156.

80. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li DQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23:63-73.
81. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:3156-3161.
82. Di IE, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De LM. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:9523-9528.
83. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 2004; 565:6-10.
84. Kubota M, Shimmura S, Miyashita H, Kawashima M, Kawakita T, Tsubota K. The anti-oxidative role of ABCG2 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:5617-5622.
85. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. P63 is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature* 1999; 398:714-718.
86. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999; 145:769-782.
87. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:2302-2306.
88. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoude GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008; 456:250-254.
89. Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 2000; 48:1291-1306.
90. Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, Tsubota K. Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts. *Mol Vis* 2006; 12:478-484.
91. Pinnamaneni N, Funderburgh JL. Concise review: Stem cells in the corneal stroma. *Stem Cells* 2012; 30:1059-1063.
92. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:497-503.
93. Funderburgh ML, Du Y, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *FASEB J* 2005; 19:1371-1373.
94. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis* 2008; 14:431-442.
95. Branch MJ, Hashmani K, Dhillon P, Jones DR, Dua HS, Hopkinson A. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:5109-5116.
96. Li GG, Zhu YT, Xie HT, Chen SY, Tseng SC. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:5686-5697.
97. Espana EM, Kawakita T, Romano A, et al. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:5130-5135.
98. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in

- the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat* 1991; 177:75-84.
99. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80:155-171.
100. Espana EM, Ti SE, Grueterich M, Touhami A, Tseng SC. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1509-1514.
101. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1991; 89:721-756.
102. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:529-532.
103. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. 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; 25:1402-1409.
104. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1442-1443.
105. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000; 48:83-92.
106. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J* 1994; 20:64-72.
107. Wei ZG, Wu RM, Lavker R, Sun TT. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar fornix and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 34:1814-1828.
108. Coster D, Aggarwal R, Williams K. Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cells allografts. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:977-982.
109. Espana EM, Grueterich M, Romano AC, Touhami A, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; 109:2004-2010.
110. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994; 78:401-408.
111. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:96-105.
112. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol* 1977; 84:798-801.
113. Puangsrichareon V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102:1476-1485.
114. De Nicola R, Labbe A, Amar N, Dupas B, Baudouin C. In vivo confocal microscopy and ocular surface diseases: anatomical-clinical correlations. *J Fr Ophthalmol* 2005; 28:691-698.
115. Lagali N, Eden U, Utheim TP, et al. In vivo morphology of the limbal palisades of vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:5333-5342.
116. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem

- cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:431-441.
117. Peris C, Menezo JL. Anatomía-histología de la placenta humana. In: *Membrana amniótica y superficie ocular*. MAC LINE, 2004; 39-44.
118. Meller D, Pires RT, Mack RJ, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000; 107:980-9; discussion 990.
119. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:748-752.
120. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2010; 31:216-225.
121. Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti SE, Tseng SC. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; 109:1547-1552.
122. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709-722.
123. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340:1697-1703.
124. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol* 2007; 52:483-502.
125. Madhira SL, Vemuganti G, Bhaduri A, Gaddipati S, Sangwan VS, Ghanekar Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2008; 14:189-196.
126. Chen HC, Chen HL, Lai JY, et al. Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:4660-4668.
127. Shimazaki J, Higa K, Kato N, Satake Y. Barrier function of cultivated limbal and oral mucosal epithelial cell sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:5672-5680.
128. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De LM. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; 349:990-993.
129. Ramirez-Villagran B, Pastor M, Herreras J, et al. Treatment of Ocular Surface Failure Due to Limbal Stem Cell Deficiency by Cultivated Limbal Epithelial Cell Transplantation (CLET). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; ARVO E-abstract, ID 5433 - A0132.
130. Burman S, Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol* 2008; 2:489-502.
131. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, et al. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008; 115:1989-1997.
132. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful Clinical Implementation of Corneal Epithelial Stem Cell Therapy for Treatment of Unilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Stem Cells* 2009.
133. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De LM, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010; 363:147-155.

134. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem* 2011; 112:993-1002.
135. Lopez-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, et al. Consecutive Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells from a Single Limbal Biopsy. *Curr Eye Res* 2013.
136. de la Mata A, Nieto-Miguel T, Lopez-Paniagua M, et al. Chitosan-gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2013.
137. Mariappan I, Maddileti S, Savy S, et al. In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc* 2010; 5:1470-1479.
138. Takagi R, Yamato M, Murakami D, et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2010.
139. Ghoubay-Benallaoua D, Pecha F, Goldschmidt P, et al. Effects of isoproterenol and cholera toxin on human limbal epithelial cell cultures. *Curr Eye Res* 2012; 37:644-653.
140. Albert R, Vereb Z, Csomos K, et al. Cultivation and characterization of cornea limbal epithelial stem cells on lens capsule in animal material-free medium. *PLoS One* 2012; 7:e47187.
141. Stasi K, Goings D, Huang J, et al. Optimal Isolation and Xeno-free culture conditions for limbal stem cell function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013.
142. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343:86-93.
143. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:1280-1284.
144. Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods. *Biosci Rep* 2003; 23:169-174.
145. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:2976-2989.
146. Schwab IR, Johnson NT, Harkin DG. Inherent risks associated with manufacture of bioengineered ocular surface tissue. *Arch Ophthalmol* 2006; 124:1734-1740.
147. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2006; 54:29-34.
148. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108:1569-1574.
149. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 1978; 15:801-811.
150. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:5665-5668.
151. Cao XG, Li XX, Bao YZ, Xing NZ, Chen Y. Responses of human lens epithelial cells to quercetin and DMSO. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:3714-3718.

152. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B* 2007; 111:10453-10460.
153. Caselli D, Tintori V, Messeri A, Frenos S, Bambi F, Arico M. Respiratory depression and somnolence in children receiving dimethylsulfoxide and morphine during hematopoietic stem cells transplantation. *Haematologica* 2009; 94:152-153.
154. Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K, Coroneo MT, Wakefield D, Watson SL. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009; 87:1571-1578.
155. Pathak M, Cholidis S, Haug K, et al. Clinical transplantation of ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells using a culture medium with human serum as single supplement: a retrospective case series. *Acta Ophthalmol* 2012.
156. Shahdadfar A, Haug K, Pathak M, et al. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. *Exp Eye Res* 2012; 97:1-9.
157. Takahashi N, Chikama T, Yanai R, Nishida T. Structures of the corneal limbus detected by laser-scanning confocal biomicroscopy as related to the palisades of Vogt detected by slit-lamp microscopy. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53:199-203.
158. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001; 79:214-221.
159. Li W, Hayashida Y, He H, Kuo CL, Tseng SC. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:605-613.
160. Selver OB, Barash A, Ahmed M, Wolosin JM. ABCG2-dependent dye exclusion activity and clonal potential in epithelial cells continuously growing for 1 month from limbal explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:4330-4337.
161. Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2114-2121.
162. Kim HS, Jun S,X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res* 2004; 79:41-49.
163. Zhang X, Sun H, Tang X, et al. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2005; 80:227-233.
164. raki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:614-621.
165. Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, et al. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* 1993; 106 (Pt 3):771-783.
166. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 1990; 50:6334-6343.
167. Notara M, Shortt AJ, Galatowicz G, Calder V, Daniels JT. IL6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of

- epithelial-stromal interaction. *Stem Cell Res* 2010; 5:188-200.
168. TODARO GJ, GREEN H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963; 17:299-313.
169. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20.
170. James SE, Rowe A, Ilari L, Daya S, Martin R. The potential for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea* 2001; 20:488-494.
171. Notara M, Shortt AJ, O'Callaghan AR, Daniels JT. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche. *Age (Dordr)* 2012.
172. Vemuganti GK, Kashyap S, Sangwan VS, Singh S. Ex-vivo potential of cadaveric and fresh limbal tissues to regenerate cultured epithelium. *Indian J Ophthalmol* 2004; 52:113-120.
173. Utheim TP, Raeder S, Olstad OK, et al. Comparison of the histology, gene expression profile, and phenotype of cultured human limbal epithelial cells from different limbal regions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:5165-5172.
174. Yanai R, Yamada N, Inui M, Nishida T. Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2006; 83:76-83.
175. Formanek M, Millesi W, Willheim M, Scheiner O, Kornfehl J. Optimized growth medium for primary culture of human oral keratinocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996; 25:157-160.
176. Barnes D, Sato G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 1980; 102:255-270.
177. Gronbaek H, Frystyk J, Orskov H, Flyvbjerg A. Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor-binding proteins and insulin-like growth factor-I in rats. *J Endocrinol* 1995; 145:105-112.
178. Marcelo CL. Differential effects of cAMP and cGMP on in vitro epidermal cell growth. *Exp Cell Res* 1979; 120:201-210.
179. Moss J, Vaughan M. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Annu Rev Biochem* 1979; 48:581-600.
180. Delescluse C, Colburn NH, Duell EA, Voorhees JJ. Cyclic AMP-elevating agents inhibit proliferation of keratinizing guinea pig epidermal cells. *Differentiation* 1974; 2:343-350.
181. Yamanishi K, Kishimoto S, Yasuno H. Cyclic AMP as a negative regulator of DNA synthesis in FRSK cells, a fetal rat epidermal cell line. *J Dermatol* 1989; 16:2-6.
182. Okada N, Kitano Y, Ichihara K. Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. *J Invest Dermatol* 1982; 79:42-47.
183. Ma X, Shimmura S, Miyashita H, et al. Long-term culture and growth kinetics of murine corneal epithelial cells expanded from single corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:2716-2721.
184. Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Characterization of the corneal surface in limbal stem cell deficiency and after transplantation of cultivated limbal epithelium. *Ophthalmology* 2009; 116:1048-1056.
185. Notara M, Alatza A, Gilfillan J, et al. In sickness and in health: Corneal

- epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Res* 2010; 90:188-195.
186. O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells* 2011; 29:1923-1932.
187. Ordonez P, Di GN. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. *Stem Cells* 2012; 30:100-107.
188. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, et al. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:4780-4786.
189. Kurpakus MA, Maniaci MT, Esco M. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. *Curr Eye Res* 1994; 13:805-814.
190. Martinez-Conesa EM, Espel E, Reina M, Casaroli-Marano RP. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011.
191. Chen SY, Hayashida Y, Chen MY, Xie HT, Tseng SC. A new isolation method of human limbal progenitor cells by maintaining close association with their niche cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17:537-548.
192. Kawakita T, Espana EM, He H, Li W, Liu CY, Tseng SC. Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure. *Am J Pathol* 2005; 167:381-393.
193. Tan EK, He H, Tseng SC. Epidermal Differentiation and Loss of Clonal Growth Potential of Human Limbal Basal Epithelial Progenitor Cells during Intrastromal Invasion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011.
194. Reinshagen H, uw-Haedrich C, Sorg RV, et al. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol* 2011; 89:741-748.
195. Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, et al. In Vitro Simulation of Corneal Epithelium Microenvironment Induces a Corneal Epithelial-like Cell Phenotype from Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells. *Curr Eye Res* 2013; 38:933-944.
196. HEMPHILL JJ, HERMAN YF, YOUNG VM. Comparative antifungal activity of nystatin and amphotericin B in tissue culture for virus propagation. *Antibiot Annu* 1957; 5:961-966.
197. Fischer AB. Gentamicin as a bactericidal antibiotic in tissue culture. *Med Microbiol Immunol* 1975; 161:23-39.
198. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6:331-343.
199. Monakhova EV, Pisanov RV. Toxins of *Vibrio cholerae*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2005; (1):7-18.
200. Powell JA, Duell EA, Voorhees JJ. Beta adrenergic stimulation of endogenous epidermal cyclic AMP formation. *Arch Dermatol* 1971; 104:359-365.
201. Flaxman BA, Harper RA. In vitro analysis of the control of keratinocyte proliferation in human epidermis by physiologic and pharmacologic agents. *J Invest Dermatol* 1975; 65:52-59.
202. Gill DM. Mechanism of action of cholera toxin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1977; 8:85-118.
203. Allen-Hoffmann BL, Rheinwald JG. Polycyclic aromatic hydrocarbon

- mutagenesis of human epidermal keratinocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:7802-7806.
204. Puzianowska-Kuznicka M, Pietrzak M, Turowska O, Nauman A. Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim Pol* 2006; 53:641-650.
205. Cheng SY. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev Endocr Metab Disord* 2000; 1:9-18.
206. Weiss RE, Ramos HE. Thyroid hormone receptor subtypes and their interaction with steroid receptor coactivators. *Vitam Horm* 2004; 68:185-207.
207. Shahrara S, Drvota V, Sylven C. Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. *Biol Pharm Bull* 1999; 22:1027-1033.
208. Safer JD, Crawford TM, Holick MF. Topical thyroid hormone accelerates wound healing in mice. *Endocrinology* 2005; 146:4425-4430.
209. Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology* 2003; 37:79-86.
210. Ohmura T, Katyal SL, Locker J, Ledda-Columbano GM, Columbano A, Shinozuka H. Induction of cellular DNA synthesis in the pancreas and kidneys of rats by peroxisome proliferators, 9-cis retinoic acid, and 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Cancer Res* 1997; 57:795-798.
211. Foster MP, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Proliferation of bone marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. *J Immunol* 1999; 163:5883-5890.
212. Gonzalez-Sancho JM, Figueroa A, Lopez-Barahona M, Lopez E, Beug H, Munoz A. Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells. *Mol Carcinog* 2002; 34:25-34.
213. Blumenberg M, Connolly DM, Freedberg IM. Regulation of keratin gene expression: the role of the nuclear receptors for retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D3. *J Invest Dermatol* 1992; 98:42S-49S.
214. Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis* 2003; 9:635-643.
215. Kim MK, Lee JL, Shin KS, et al. Isolation of putative corneal epithelial stem cells from cultured limbal tissue. *Korean J Ophthalmol* 2006; 20:55-61.
216. Cook PW, Ashton NM, Pittelkow MR. Adenosine and adenine nucleotides inhibit the autonomous and epidermal growth factor-mediated proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 104:976-981.
217. Santos NC, Figueira-Coelho J, Saldanha C, Martins-Silva J. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethylsulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium* 2002; 31:183-188.
218. Liu J, Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:63-74.
219. Akkok CA, Liseth K, Nesthus I, et al. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. *Transfusion* 2008; 48:877-883.

220. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* 2009; 34:1-10.
221. Akkok CA, Holte MR, Tangen JM, Ostenstad B, Bruserud O. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. *Transfusion* 2009; 49:354-361.
222. Maciag T, Nimore RE, Weinstein R, Gilchrist BA. An endocrine approach to the control of epidermal growth: serum-free cultivation of human keratinocytes. *Science* 1981; 211:1452-1454.
223. McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:2023-2027.
224. Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 2003; 278:39428-39434.
225. Nakamura T, Ang LP, Rigby H, et al. The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:909-916.
226. Liu Z, Wan P, Duan H, et al. ES micro-environment enhances stemness and inhibits apoptosis in human limbal stem cells via the maintenance of telomerase activity. *PLoS One* 2013; 8:e53576.
227. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK. Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1822-1828.
228. Chen W, Hara K, Tian Q, Zhao K, Yoshitomi T. Existence of small slow-cycling Langerhans cells in the limbal basal epithelium that express ABCG2. *Exp Eye Res* 2007; 84:626-634.
229. Zito-Abbad E, Borderie VM, Baudrimont M, et al. Corneal epithelial cultures generated from organ-cultured limbal tissue: factors influencing epithelial cell growth. *Curr Eye Res* 2006; 31:391-399.
230. Chen TT, Wu RL, Castro-Munozledo F, Sun TT. Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17:3056-3064.
231. Nieto-Miguel T, Calonge M, de la Mata A, et al. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Mol Vis* 2011; 17:2102-2117.
232. Dormandy TL. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1978; 1:647-650.
233. Musselmann K, Alexandrou B, Kane B, Hassell JR. Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin. *J Biol Chem* 2005; 280:32634-32639.
234. Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:963-967.
235. Yu FS, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 2010; 81:229-235.
236. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 2011; 47:R1-10.
237. Shanley LJ, McCaig CD, Forrester JV, Zhao M. Insulin, not leptin, promotes in vitro cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium.

- Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:1088-1094.
238. Barnes CJ, Kumar R. Epidermal growth factor receptor family tyrosine kinases as signal integrators and therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22:301-307.
239. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:637-643.
240. Yang H, Sun X, Wang Z, et al. EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells. *J Membr Biol* 2003; 194:47-58.
241. Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L. Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. *J Membr Biol* 2003; 196:41-50.
242. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:2544-2561.
243. Pancholi S, Tullo A, Khaliq A, Foreman D, Boulton M. The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236:1-8.
244. Meyer-Blazejewska EA, Kruse FE, Bitterer K, et al. Preservation of the limbal stem cell phenotype by appropriate culture techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:765-774.
245. Kruse FE, Tseng SC. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1963-1976.
246. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240:889-895.
247. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, et al. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 1990; 62:1205-1215.
248. Li DQ, Chen Z, Song XJ, de Paiva CS, Kim HS, Pflugfelder SC. 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; 80:581-590.
249. Kawakita T. Improvement in the method of cultivated corneal epithelial sheet generation. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 2011; 115:1007-1014.
250. Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2007; 2:919-927.
251. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, 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; 7:1028-1034.
252. Budak MT, Alpdogan OS, Zhou M, Lavker RM, Akinci MA, Wolosin JM. Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *J Cell Sci* 2005; 118:1715-1724.
253. Zhang X, Sun H, Li X, Yuan X, Zhang L, Zhao S. Utilization of human limbal mesenchymal cells as feeder layers for human limbal stem cells cultured on amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; 4:38-44.
254. Lekhanont K, Choubtum L, Chuck RS, Sa-ngiampornpanit T, Chuckpaiwong V, Vongthongsri A. A serum- and feeder-free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane. *Mol Vis* 2009; 15:1294-1302.

255. Mimura T, Yamagami S, Uchida S, et al. Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Mol Vis* 2010; 16:1712-1719.

256. Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:123-134.

ANNEXO I / ANNEX I. Abbreviations / Acronyms

ABCG2	Proteína transportadora de membrana ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	Desoxyribonucleic acid
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico	Cyclic adenosine monophosphate
ARNm/mRNA	Acido ribonucleico mensajero	Messenger ribonucleic acid
CD11c	Integrina - α X	α X - integrin
CMEL/LESC	Células madre epiteliales limbares	Limbal epithelial stem cell
CPL/LPC	Cultivo primario de limbo	Limbal primary culture
DMEM	Medio de cultivo modificado de Dulbecco	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimetil sulfóxido	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
EL/LE	Explante limbar	Limbal explant
EGF	Factor de crecimiento epitelial	Epithelial grow factor
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epitelial	Epithelial grow factor receptor
FBS	Suero fetal bovino	Fetal bovine serum
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Solución salina de Hanks	Hank's Balanced Salt Solution
HCE	Línea celular de epitelio corneal humano	Human corneal epithelial cell line

HT29MTX	Línea celular de adenocarcinoma de colon	Colorectal adenocarcinoma cell line
ITS	Solución de insulina, trnasferirina y selenio	Insulin, transferrin, and selenite solution
iPCS	Células madre pluripotenciales inducidas	Induced pluripotent stem cells
K	Citoqueratina	Keratin
K3	Citoqueratina 3	Keratin 3
K12	Citoqueratina 12	Keratin 12
K14	Citoqueratina 14	Keratin 14
K15	Citoqueratina 15	Keratin 15
MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos	Kinase mitogen-activated protein kinase
MART-1	Antígeno asociado a melanoma reconocido por células T	Melanoma associated antigen recognized by T cells
PBS	Solución salina fostato	Phosphate buffered saline
PECAM	Molécula de adhesión endotelial	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PCR	Reacción en cadaena de la polímerasa	Polymerase chain reaction
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa	Phosphatidylinositide 3-kinases
p63	Factor de transcripción nucleolar p63	Nuclear transcription factor p63
p63α	Factor de transcripción nucleolar p63, isoforma α	Nuclear transcription factor p63 isoform α
ΔNp63α	Factor de transcripción nucleolar p63, isoforma $\Delta\alpha$	Nuclear factor transcription p63 isoform $\Delta\alpha$

RT	Transcripción reversa	Reverse transcription
SH/HS	Suero humano	Human serum
SIL/LSCD	Síndrome de insuficiencia límbica	Limbal stem cell deficiency
S100A4	Proteína transmembrana S100A4	S100 calcium binding protein A4
T3	Triiodotironina	Triiodothyronine
UFC/CFE	Unidades formadoras de colonias	Colony forming efficiency
UVA	Ultravioleta tipo-A	Ultraviolet-A
3T3/J2	Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón albino	Mice embryonic 3T3/J2 fibroblasts cell line

ANEXO II/ANEXX II. Materiales / Materials

CULTIVO CELULAR / CELL CULTURE		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Plásticos y vidrios / Plastic and glass		
Frascos de cultivo / Flask of 75 cm ²	Nunc	156499
Frascos de cultivo / Flask of 175 cm ²	Nunc	159910
Placa de Petri de / Petri's dish of 100 mm	Corning	CO430167
Placa de Petri de / Petri's dish of 35 mm	Nunc	126794
Placas Permax [®] multichamber 8 pocillos/ Permax [®] multichamber 8 wells	Thermo Scientific	177445
Placas poliestireno de 12 pocillos/ Polystyrene multichamber 12 wells	Nunc/Sigma-Aldrich	150628
Soluciones y reactivos / Solutions and reagents		
Azul tripán / Trypan blue	Sigma-Aldrich	T8154
Dispasa II / Dispase II	Invitrogen-Gibco	17105
Colagenasa I / Collagenase I	Invitrogen-Gibco	17100
HBSS	Invitrogen-Gibco	14025
PBS	Invitrogen-Gibco	14190
Tripsina-EDTA / Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen-Gibco	25300
Tripsina-EDTA / Trypsin-EDTA 0,25 %	Invitrogen-Gibco	25200
Tripsina-EDTA / Trypsin-EDTA 0,5% (10X)	Invitrogen-Gibco	15400
Material quirúrgico / Surgical materials		
Bisturí / Scalpel	Romed	
Escarificador / Knife	John Weiss	
Pinzas / Tweezers	John Weiss	
Tijeras / Scissors	John Weiss	
Trépano de / Punch of 7,5 mm	Katena	
Compuestos para medios de cultivo / Components for culture media		
Adenina / Adenine	Sigma-Aldrich	A2786
Anfotericina B / Amphotericin	Invitrogen-Gibco	15290-026
Bicarbonato sódico / Sodium bicarbonate	Invitrogen-Gibco	25080
CnT20	CELLnTEC	-
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
DMEM/F12-GlutaMAX [™] (3,1 g/l glucosa y piruvato / glucose and pyruvate)	Invitrogen-Gibco	31331028
DMEM/F12-GlutaMAX [™] (4,5 g/l glucosa y sin piruvato / glucose and without pyruvate)	Invitrogen-Gibco	61965-026
DMEM/F12-GlutaMAX [™] (1 g/l glucosa y piruvato / glucose and pyruvate)	Invitrogen-Gibco	21885

EGF	Sigma-Aldrich	E9644
Gentamicina / Gentamicin	Invitrogen-Gibco	15750-037
Hidrocortisona / Hydrocortisone	Sigma-Aldrich	H0135
Insulina humana / Human insulin	Invitrogen-Gibco	12585-014
ITS	Sigma-Aldrich	I3146
Isoproterenol / Isoproterenol	Sigma-Aldrich	I5627
MENNEAA 100X	Invitrogen-Gibco	11140
Penicilina-Streptomocina / Penicillin-Streptomycin	Invitrogen-Gibco	15070-063
Solución Antibiótico-Antifúngico (10.000 U/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomocina 25 µg/ml de anfotericina) / Antibiotic-Antifungal solution (10.000 U/ml de penicillin, 10.000 µg/ml de streptomycin 25 µg/ml de amphoterycin)	Invitrogen-Gibco	15240-062
Suero adulto bovino / Adult bovine serum	Sigma-Aldrich	B9433
FBS	Invitrogen-Gibco	10106-169
SH / HS	Lonza	14-491E
Toxina colérica / Cholera toxin	Gentaur	Gentaur 100
Transferrina / Transferrin	Sigma	T8158
Triiodotironina / Triiodothyronine	Sigma-Aldrich	T6397

RT-PCR A TIEMPO REAL / REAL TIME RT-PCR		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Homogeneización y purificación de ARN / Homogenization and RNA purification		
Agua libre de nucleasas / nuclease free water	Sigma-Aldrich	W-4502
β-mercaptoetanol / β-mercaptoethanol	Merk	56263340
Columna / Colum Qiashredder	Qiagen	79656
Etanol / Ethanol	Panreac	141086.1211
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RNeasy minikit	Qiagen	74106
Tampón / Buffer RLT	Qiagen	79216
Tampón / Buffer RPE	Qiagen	1018013
Tampón / Buffer RW1	Qiagen	1053394
Quantificación de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR a tiempo real / Quantification of RNA, cDNA synthesis and real time RT-PCR		
Quant iT RNA	Invitrogen	Q32855
SuperScrip Vilo	Invitrogen	11754-250
Placas de 96 pocillos / Multichamber 96 wells	Applied Biosystem	MicroAmp 4306737
Taqman Universal PCR Mix	Applied Biosystem	4304437

Sondas Taqman®		
Sondas / Probes	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
<i>ABCG2</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00184979_m1
<i>GAPDH</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	4352934E
<i>KRT 12</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00165015_m1
<i>KRT 14</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00559328_m1
<i>KRT 15</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00267035_m1
<i>KRT 3</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00365080_m1
<i>p63 alpha</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00978338_m1
<i>S100A4</i>	Applied Biosystem (Invitrogen)	Hs00243201_m1

INMUNOFUORESCENCIA / IMMUNOFUORESCENCE		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / References
Cubreobjetos / Coverslips	Thermo Scientifics	65.300.15
Ioduro de propidio / Propidium iodide	Invitrogen/Gibco	P-3566
Medio de montaje de fluorescencia / Fluorescence mounting medium	Vector	Vecta shield H-1000
Poli-L-lisina / Poly-L-lysine	Sigma-Aldrich	P8920
Portaobjetos de vidrio / Slide	Menzel glaser	AA00000112E
Shandon EZ-double cytofunnels	Thermo Scientifics	A 78710021
Suero de burro / Donkey serum	Sigma-Aldrich	D9663
Tritón / Triton	Sigma-Aldrich	028K0011

Anticuerpos / Antibodies		
Anticuerpos / Antibodies	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
<i>ABCG2</i>	Chemicon-Millipore	MAB4146
<i>AE5 (K3)</i>	Mp Biomedical	69143
Anti-conejo IgG (Alexafluor 488)	Invitrogen	A21206
Anti-ratón IgG (Alexafluor 488)	Invitrogen	A21202
<i>CD11c</i>	Santa Cruz Biotechnology	CS-19989
<i>K 12</i>	Santa Cruz Biotechnology	SC-25722
<i>K 14</i>	Chemicon/Millipore	MAB3232
<i>K 15</i>	Chemicon/Millipore	CBL272
<i>Ki67</i>	Dako	M7240
<i>MART-1</i>	Abcam	AB785
<i>p63α</i>	Cell Signalling	4892
<i>p63</i>	Santa Cruz Biotechnology	SC-8431
<i>PECAM</i>	Oncogne	CP50
<i>S100A4</i>	Abcam	AB11333

ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD CLONOGENICITY ASSAYS		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Cilindros de vidrio / Glass cylinders	Sigma-Aldrich	C1059
Mitomicina-C / Mitomycin	Sigma-Aldrich	M4287
Rodamina B / Rhodamine	Sigma-Aldrich	R6626
Silicona / Silicone	Sigma-Aldrich	Z273554

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION / TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Acetato de uranilo / Uranyl acetate	Sigma-Aldrich	73943
Azul de toluidina / Toluidine blue	Sigma-Aldrich	89640
Citrato de plomo / Lead citrate	Merck	111037
Cubre de / Coverslips of Thermanox® (22 mm)	Nunc	174977
Cubre de / Coverslips of Thermanox® (13 m)	Nunc	174950
Oxido de propileno / Propylene oxide	Merck	807027
Resina SPURR / SPURR resin	TAAB Laboratories	S024D
Tetraoxido de osmio / Osmium tetroxide	Merck	124505

HISTOLOGIA / HISTOLOGY		
Materiales / Materials	Casa comercial / Sources	Referencia / Reference
Acido periódico / Periodic acid	Sigma	P5463
Tissue-Tek-OCT®	Sakura	4583
Entellan	Merck	1.07961.0500
Hematoxilina II de Gill / Hematoxylin	Merck	1.05174.1000
Reactivo de Shiff / Shiff' reagent	Merck	1.09033.0500
Sacarosa / Sucrose	Panreac	131621.1211

REACTIVOS PARA SOLUCIONES Y FIJADORES / REAGENTS		
Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / reference
Acido clorhídrico 35% / Hydrochloric acid	Panreac	131019
Cacodilato sódico / Sodium cacodylate	Sigma-Aldrich	C0250
Etanol / Ethanol	Panreac	121086.1214
Fosfato sódico dibásico / Dibasic sodium phosphate	Panreac	131679.1210
Fosfato sódico monobásico / Monobasic sodium phosphate	Sigma-Aldrich	S0751
Formaldehído / Formaldehyde	Panreac	253572.1211
Glutaraldehído 25% / Glutaraldehyde	Panreac	253857.1611
Hidróxido sódico / Sodium hydroxyde	Panreac	141687.1211
Metanol / Methanol	Panreac	141091.1214
Paraformaldehído / Paraformaldehyde	Panreac	141451.1211

