

**CO-CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES Y
FIBROBLASTOS DE CONJUNTIVA**

GIRLEZA MONTOYA GUACANEME

Código 598115

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE CIRUGÍA
BOGOTÁ 2011**

**CO-CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES Y
FIBROBLASTOS DE CONJUNTIVA**

GIRLEZA MONTOYA GUACANEME

**TRABAJO DE GRADO COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL TÍTULO
DE ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGÍA**

**DIRECTOR
Dr. JUAN MANUEL PARDO**

**CO DIRECTORA
MARTA RAQUEL FONTANILLA, Q.F., Ph.D**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE OFTALMOLOGÍA
BOGOTÁ ENERO 2011**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, cuya presencia a mi lado ha sido constante a lo largo de la vida y a quien le debo todo.

A mis padres sin cuyo valioso esfuerzo, acompañamiento y ayuda no hubiera alcanzado los logros que he tenido.

A mi hermana, por aquellas horas de descanso que sacrificó dispuesta a apoyarme tanto en lo personal como en lo profesional.

A Colciencias por la financiación de este proyecto.

Al Grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia en cabeza de la Doctora Marta Fontanilla, por abrirme los ojos ante la inmensidad del campo de la ingeniería de tejidos; a Juan Felipe a Edward a Lady, a Diana N, a Julio, a Diana M, todos colaboradores invaluable de este trabajo.

Al Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares de la Universidad de Antioquia por su colaboración en momentos críticos.

Al profesor Juan Manuel Pardo por su apoyo y correcciones en la elaboración del presente trabajo.

Al profesor Crisanto de Jesús Moreno ejemplo a seguir como persona y como profesional.

Finalmente a Eduardo, tu apoyo, preocupación y ayuda constantes me fortalecieron en los momentos de mayor duda.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	8
ABSTRACT	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1 GENERALIDADES ACERCA DE LA CONJUNTIVA.....	14
3.2 LESIONES DE LA SUPERFICIE OCULAR.....	23
3.3 ESTADO DEL ARTE	29
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 OBJETIVO GENERAL:	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
5. DISPOSICIONES VIGENTES	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1 MATERIALES.....	35
6.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	35
6.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES.....	36
6.4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS	38
6.5 OBTENCIÓN DE LOS SOPORTES DE COLAGENO TIPO I.....	39
6.6 OBTENCIÓN DEL COCULTIVO	40
7. RESULTADOS	42
7.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES	42
7.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS	45
7.3 OBTENCIÓN DEL COCULTIVO	46
7.4 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA- HISTOQUÍMICA.....	47
7.5 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	49
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	51
9. BIBLIOGRAFIA	54

FIGURAS

Página

Figura 1. Cuenca lacrimal, conteniendo el mar lacrimal.....	14
Figura 2. Histología de la Conjuntiva.....	15
Figura 3. Esquema de la disposición y densidad de las células caliciformes en la cuenca lacrimal.....	14
Figura 4. Estructura de las dos clases de mucinas: secretadas y asociadas a membrana	19
Figura 5. Esquema célula caliciforme.....	21
Figura 6. La película lagrimal.....	22
Figura 7. Palisadas de Vogt en limbo.....	23
Figura 8. Xeroftalmía por Avitaminosis A.....	26
Figura 9. Secuelas oculares de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson.....	27
Figura 10. Secuelas oculares de un paciente con Penfigoide ocular	27
Figura 11. Secuelas oculares de una lesión química	28
Figura 12. Monocapa de queratinocitos cultivados 10x.....	42
Figura 13. Monocapa de queratinocitos cultivados.....	43
Figura 14. Capa alimentadora de fibroblastos 3T3.....	43
Figura 15. Explantes sobre coagulo de fibrina..	44
Figura 16. Explantes sobre coagulo de fibrina.....	45
Figura 17. Fibroblastos en cultivo.....	45
Figura 19. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Día 20.....	47
Figura 20. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción H-E.....	48
Figura 21. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción H-E.....	48
Figura 22. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción PAS.....	48
Figura 22. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7.....	49
Figura 23. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7.....	50
Figura 24. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7 + Vimentina.....	50

TABLAS

Página

Tabla 1. Densidad media y desviación estándar de células caliciformes de la conjuntiva por milímetro cuadrado	166
Tabla 2. Clasificación de las enfermedades de la superficie ocular con lesión de células madre limbares.	244

1. RESUMEN

Propósito: Desarrollar un co-cultivo de células epiteliales y fibroblastos de conjuntiva, en soportes de colágeno tipo I, que permita avanzar en el proceso de la creación de un sustituto de conjuntiva, para el tratamiento de patologías que comprometen de forma severa la superficie ocular y causan déficit visual; para que, a largo plazo, sea una alternativa a las opciones terapéuticas disponibles para estos pacientes.

Método: Los cultivos primarios de células epiteliales y fibroblastos, se consiguieron a partir de biopsias de tejido conjuntival de conejos Nueva Zelanda, mediante el método de explantes, siguiendo los lineamientos establecidos por Vásquez, Pardo y Fontanilla (2009) y mediante la técnica de disgregación enzimática. Las células crecieron en dos medios de cultivo, según el tipo celular: K-SFM, para las células epiteliales, y DMEM suplementado con Suero fetal Bovino al 10% para los fibroblastos. Luego se procedió a preparar los soportes de colágeno tipo I, sembrar en ellos los fibroblastos y posteriormente las células epiteliales obtenidas, dichos co-cultivos fueron analizados mediante histología, histoquímica e inmunohistoquímica.

Resultados: Se obtuvieron co-cultivos de células epiteliales y fibroblastos, comprobado mediante histología, histoquímica e inmunohistoquímica, expresados en el crecimiento de los dos tipos celulares cultivados en los soportes, que estaban dispersados en áreas diferentes para cada tipo celular; es decir, no se obtuvo la disposición anatómica que semeja la de la conjuntiva normal, mediante los métodos utilizados.

Conclusiones: El trabajo realizado llevó a la obtención del crecimiento de los dos tipos celulares esperados sin que se logrará éxito en cuanto a su distribución tridimensional en el soporte. Se discuten posibles variaciones que lleven al adecuado desarrollo de un co-cultivo que permita la elaboración de sustitutos de conjuntiva.

Palabras claves: Oftalmología, ingeniería de tejidos, superficie ocular, conjuntiva, cultivo celular.

ABSTRACT

Purpose: The development of a co-culture of conjunctival epithelial cells and conjunctival fibroblasts in supports of collagen type I, that allows progress in the process of creation of a conjunctival substitute for treat pathologies that compromise severely the ocular surface and cause visual deficits, so that, in the long term, be an alternative to the therapeutic options available for those patients.

Method: Primary cultures of cells were obtained from biopsies of conjunctival tissue of rabbits by the explants method, following the guidelines set by Vasquez, Pardo and Fontanilla (2009) and by enzymatic disaggregation technique. Cells were grown in two culture media, according to the cell type: K-SFM, for epithelial cells and DMEM supplemented with fetal calf serum to 10% for fibroblasts. Then we proceeded to prepare the collagen support of type I collagen, plant fibroblasts in it, and after plant the epithelial cells cultured. These cocultures were analyzed by histology, histochemistry and immunohistochemistry.

Results: Were obtained cocultures of epithelial cells and fibroblasts, found by histology, histochemistry and immunohistochemistry, expressed in the growth of the two cell types in the supports, which were scattered in different areas for each cell type. This means that, by the methods used, was not obtained the anatomical structure that resembles that of the normal conjunctive.

Conclusions: The work leading to the eventual growth of the two cell types expected without being able to succeed in their three-dimensional distribution in the supports used. Possible variations are discussed leading to the proper development of a co-culture that allows the preparation of substitutes of the conjunctive.

Key words: Ophthalmology, Tissue engineering, ocular surface, conjunctive, cellular culture

2. INTRODUCCIÓN

La superficie ocular se constituye como unidad funcional básica compuesta por la película lagrimal y los epitelios corneal y conjuntival (tanto de conjuntiva bulbar como tarsal); la interacción entre estos componentes permite por ejemplo mejorar la calidad de la imagen visual obtenida, ya que la película lagrimal actúa compensando pequeñas irregularidades de la superficie del epitelio corneal (Farjo, AA y Soong, HK. 2003). De igual manera, la película lagrimal facilita la regeneración y el recambio de células epiteliales, y refuerza la protección innata de los epitelios contra infecciones (de tipo mecánico, por sus uniones intercelulares) gracias a diferentes componentes entre los que se cuentan inmunoglobulinas, lisozima y lactoferrina (Johnson ME y Murphy PJ 2004).

La película lagrimal está compuesta por tres capas; una fase acuosa que constituye alrededor del 90% del volumen total apoyada y mezclada con una fase mucosa y cubierta por una capa lipídica que evita la evaporación y le da tensión superficial. La fase mucosa está compuesta por mucinas, sintetizadas por las células caliciformes conjuntivales, y sales inorgánicas suspendidas en agua, de dichas mucinas podemos encontrar dos clases, unas transmembrana en estrecha relación con los epitelios corneal y conjuntival formando el glicocalix y otras denominadas secretadas que se encuentran embebidas en la capa acuosa; estas mucinas cumplen una doble función de protección ante patógenos del medio ambiente y al mismo tiempo mantener humedad sobre la superficie ocular por sus propiedades hidrofílicas. La fase acuosa de la película lagrimal es rica en diferentes componentes; electrolitos, proteínas como factores de crecimiento epitelial, Vitamina A, antimicrobianos, citoquinas e inmunoglobulinas, entre otros; cumple funciones de protección antimicrobiana y estimulación de la proliferación y diferenciación del epitelio de la superficie ocular. Finalmente, la fase lipídica

sintetizada por las glándulas de meibomio ubicadas en el borde de los párpados, que tiene como función principal reducir la evaporación del componente acuoso de la lágrima en el ojo abierto, pero además evita que las lágrimas se derramen sobre la piel y posiblemente tiene alguna propiedad antimicrobiana (Johnson ME y Murphy PJ, 2004; Yiu SC *et al.*, 2007). Una de las causas más frecuentes de bajos grados de irritación crónica en los ojos, particularmente en la población mayor, es por insuficiencia lagrimal acuosa y/o en la capa lipídica, posiblemente facilitado por una reducción en el reflejo del lagrimeo que se presenta con la edad avanzada o por la presencia de comorbilidades como la artritis que disminuye la secreción basal lagrimal o la blefaritis que afecta la producción en las glándulas de meibomio; es posible determinar diferentes grados de lesión gracias a exámenes simples como la tinción positiva con rosa de bengala o verde de lisamina que se presenta cuando existe alteración de la capa de glicocalix transmembrana y por tanto nos habla de una desecación importante en las células epiteliales subyacentes o el test de Schirmer disminuido que observamos en pacientes con afección en la producción basal de lágrimas. Existe también la citología de impresión conjuntival o corneal las cuales nos brindan importante información acerca de la composición celular de la superficie lagrimal, y, en cuanto a cantidad, forma y densidad de células caliciformes.

La OMS considera la ceguera por alteraciones de la cornea como la cuarta causa de ceguera global (5.1%), después de la catarata, glaucoma y degeneración macular relacionada con la edad. (OMS, 2006). El oftalmólogo en su práctica diaria se enfrenta a patologías que afectan la superficie ocular y la transparencia corneal, con pérdida funcional de la visión. En un importante porcentaje de estos pacientes lo que encontramos es el llamado síndrome de ojo seco; en el informe del 2007 del Taller Internacional sobre Ojo Seco – DEWS (Dry Eye Workshop) se estimó una prevalencia que variaba entre el 5 y el 35% a nivel mundial teniendo los valores más altos en las edades más avanzadas.

Dada la altísima prevalencia y las dificultades que aún se evidencian en el tratamiento de estas patologías generalmente crónicas, es muy importante evaluar

si nuevas medidas terapéuticas como el trasplante de células obtenidas mediante el uso de ingeniería de tejidos, tendrían éxito en el tratamiento a largo plazo para los pacientes afectados. Patologías relacionadas con deficiencia en los componentes de la lágrima, anormalidades de la superficie palpebral o anormalidades epiteliales como el Stevens-Johnson y el pénfigo ocular, entre otras, afectan la estabilidad de la película lagrimal y la integridad de los epitelios conjuntival y corneal; es decir afectan la función de la superficie ocular, esencial para mantener la humedad y transparencia corneal. Lo anterior conduce a reacciones inflamatorias severas (Faraj HG y Hoang-Xuan T, 2001; Aragona et al., 2006), frente a las cuales el cuerpo responde regenerando el epitelio y reparando el estroma subyacente. Éste epitelio puede presentar pérdida de células caliciformes, crecimiento anormal de células epiteliales, aumento en la estratificación celular, queratinización (Metaplasia), cicatrización conjuntival, disminución de la transparencia y de la humectación corneal; vascularización, cicatrización y opacidad corneal; y finalmente pérdida funcional de la visión (Tseng, 1997. Argueso y Gipson, 2001).

El tratamiento de patologías que comprometen de forma severa la superficie ocular y causan déficit visual, puede beneficiarse de nuevas tecnologías que permiten superar las limitaciones de los tratamientos quirúrgicos convencionales, como el desarrollo de sustitutos de conjuntiva mediante ingeniería de tejidos (Samuel *et al*, 2007; Butler *et al*, 2002; Hsu *et al*, 2000; Inatomi *et al*, 2005; Pellegrini *et al*, 1997; Triana, 2004). Aunque en Colombia existen varios grupos de investigación en oftalmología (Base de datos Colciencias), hasta el momento no ha sido reportado el desarrollo de productos oculares de ingeniería de tejidos. Por lo tanto, al cumplir con el objetivo de ésta investigación se podrán desarrollar sustitutos de conjuntiva que sean evaluados preclínicamente en futuros trabajos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES ACERCA DE LA CONJUNTIVA

La conjuntiva es una mucosa delgada y transparente que recubre la porción anterior de la esclerótica hasta el limbo y la superficie posterior de los párpados. Se divide en tres partes: la porción palpebral, el fondo de saco y la porción bulbar. Su función es proteger el ojo de patógenos y agresiones externas, aportar la porción mucosa de la película lagrimal, y contribuir a mantener la integridad de la superficie ocular y la transparencia corneal (Gipson, 2004).

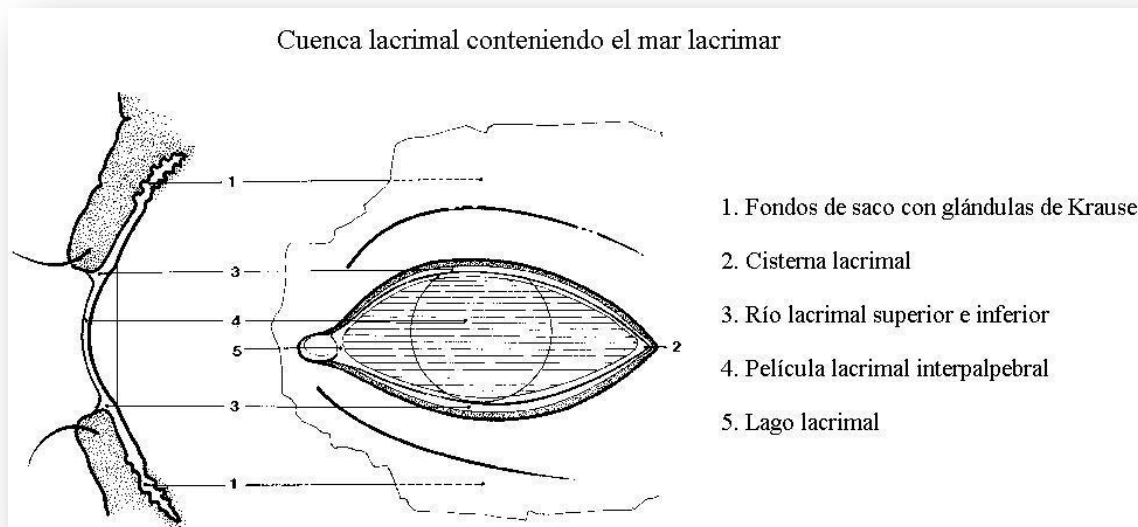


Figura 1. Cuenca lacrimal, conteniendo el mar lagrimal. Adaptado de: Ojo seco, Tomo I/Anatomía y fisiología/J. Murube/Tecnológica Editorial, 1997.

Histología:

Histológicamente la conjuntiva está formada por dos capas: el epitelio y el estroma o sustancia propia. El epitelio, no queratinizado, estratificado, descansa sobre una membrana basal que le separa del estroma. Las células epiteliales conjuntivales varían en la conjuntiva bulbar y en la palpebral. El epitelio de la conjuntiva bulbar es un epitelio pavimentoso estratificado de 5-8 capas, acentuándose la disposición pavimentosa en las inmediaciones del limbo corneal. Las células superficiales de la conjuntiva tienen forma hexagonal, de un diámetro medio de 8μ , con numerosas microvellosidades. El epitelio de la conjuntiva palpebral y parte anterior de los fondos de saco es de tipo mucoso cilíndrico de un espesor de dos células. El *estroma* tiene dos capas: Una profunda, gruesa, formada por tejido conectivo denso por el que discurren vasos y nervios y que aloja o sirve de paso a las diversas glándulas de la conjuntiva; y otra más superficial, de cinco a diez veces más fina que la anterior y de un espesor igual al del epitelio. Su trama fundamental está formada por fibras colágenas y elásticas; posee abundantes capilares y sólo esboza papilas en las inmediaciones del limbo corneal. En su espesor hay linfocitos, histiocitos y plasmocitos. (Gipson, 2004. Murube, 1997. Álvarez et al 1996)



Figura 2. Histología de la Conjuntiva. Epitelio columnar multiestratificado con células caliciformes en las capas superficiales. Debajo del epitelio hay un tejido de soporte vascular laxo. X128. Tomado de: Burkitt, HG., et al., Histología Funcional Wheater. 1997.

Células Caliciformes:

Incorporadas al epitelio se encuentran las células secretorias de mucina o células caliciformes. Éstas se disponen en la superficie conjuntival o en pequeños espacios del epitelio conjuntival, llamadas criptas mucosas de Henle (Murube, 1997) y se encargan principalmente de producir las mucinas, como la MUC5AC, responsable de mantener la integridad de la película lagrimal e hidratar la superficie ocular (Lemp et al., 1971; Kunert, 2001), además de la formación de una barrera química y física que protege los epitelios corneal y conjuntival de bacterias y daño externo; dichas mucinas pueden ser evidenciadas en el epitelio mediante tinciones como ácido periódico-Schiff (PAS) (Murakami T, et al., 2003).

Distribución:

Las células caliciformes están distribuidas con densidad diversa por toda la superficie conjuntival. La máxima concentración se encuentra en la parte medial del fondo de saco y párpados inferiores y están ausentes o son muy escasas en el anillo conjuntival perilímbico (Murube, 1997). Se distribuyen cuantitativamente según la tabla 1.

Área	Nasal	Central	Temporal
Palpebral superior	644± 173	512± 164	347±201
Fornical superior	584+83	510+86	365+99
Bulbar superior	520+ 159	451+ 122	331+ 148
Limbal superior	-	0	-
Interpalpebral	241+82	-	165+ 100
Limbal horizontal	0	-	0
Limbal inferior	-	0	-
Bulbar inferior	683+208	493+ 142	427+ 112
Fornical inferior	1677+326	830+303	672+227
Palpebral inferior	1511+325	719+211	632+ 122

Tabla 1. Densidad media y desviación estándar de células caliciformes de la conjuntiva por milímetro cuadrado (Rivas et al, 1991). Adaptado de: Ojo seco, Tomo I/Anatomía y fisiología/J. Murube/Tecnómica Editorial, 1997.

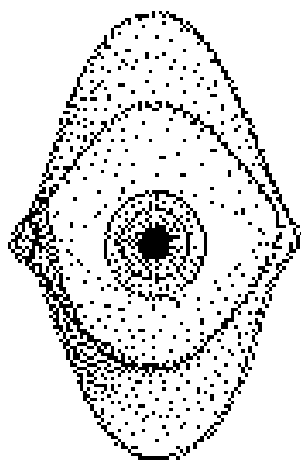


Figura 3. Esquema de la disposición y densidad de las células caliciformes en la cuenca lacrimal. La línea doble representa el margen palpebral y la línea continua, el fórnix conjuntival. Adaptado de: Ojo seco, Tomo I/Anatomía y fisiología/J. Murube/Tecnomédica Editorial, 1997.

Las células caliciformes se forman por mitosis a partir de células madres situadas en el estrato basal del epitelio conjuntival. Empujadas por la formación de nuevas células, se desplazan hacia la superficie, y a su vez van madurando. Luego de alcanzada la superficie liberan durante unos pocos días su secreción, y finalmente se desprenden a la cuenca lacrimal y son eliminadas con la lágrima (Murube, 1997).

Mucina:

Al reproducirse, la célula mucinosa carece de mucina. Ésta empieza a secretar en la segunda fase cuando la célula aún no ha alcanzado la superficie, iniciando la formación de mucina de la siguiente forma: el núcleo se rechaza hacia la base, el aparato de Golgi produce y desprende gránulos secretorios; como consecuencia, la célula aumenta de volumen. En la tercera fase la célula, una vez alcanza la superficie abierta o una cripta mucosa de Henle, vierte su contenido al mar lacrimal por un mecanismo merocrino. Esta actividad se mantiene durante unos

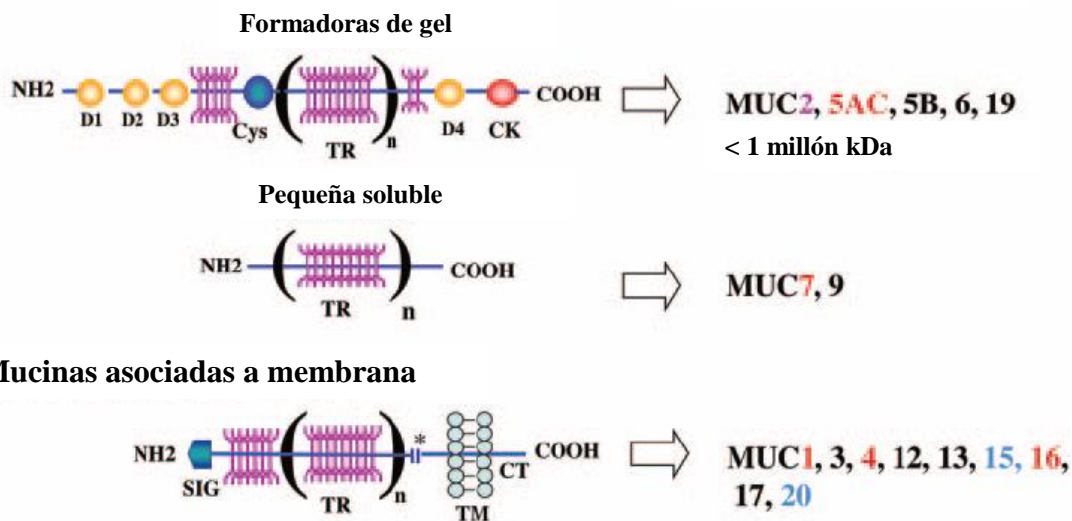
días. Finalmente, en la cuarta fase la célula deja de sintetizar y segregar mucina, y se descama a la cuenca lacrimal (Murube, 1997).

El mucus conjuntival está fundamentalmente formado por glucoproteínas, altamente glicosiladas (hasta 50-60%) las cuales, como su nombre indica, tienen un componente proteico y otro hidrocarbonado. El *componente proteico*, que constituye algo menos del 50% de la glucoproteína, es una larga cadena polipeptídica cuyos aminoácidos más abundantes son serina, treonina y prolina, y en la que también participan residuos de cisteína, cuyos grupos sulfhidrilos forman puentes disulfuro con grupos similares. Estas cadenas polipeptídicas están ligadas entre sí por sus N y C terminales y por interacciones entre las cadenas hidrofóbicas de sus aminoácidos. El *componente glicosilado*, que constituye algo más de la mitad de la glucoproteína, forma alrededor de la cadena polipeptídica una cubierta incompleta de cortas cadenas laterales de carbohidratos, ligadas a la cadena polipeptídica por enlaces covalentes. Entre estos oligosacáridos están el ácido siálico, fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. El grupo extremo de estas cadenas laterales suele ser un ácido siálico. El ácido N-acetilneuramínico, al pH lacrimal, está completamente ionizado, aportando a las moléculas una densa carga negativa y una clara asimetría axial. El componente glicosilado de las mucinas varía según la función que estas mucinas hayan de cumplir (Murube, 1997).

En el cuerpo humano se han aislado 19 genes diferentes para mucinas. Cada gene de la mucina tiene una secuencia y una longitud única de aminoácido, y sus alelos varían en el número de repeticiones de la secuencia. Los genes humanos de la mucina se señalan MUC1, -2, de acuerdo al orden en que han sido descubiertos. De acuerdo a la secuencia de los genes las mucinas han sido clasificadas en dos categorías: secretadas y asociadas a membrana (Gendler Sj et al, 1995).

Mucinas secretadas

19 genes de mucinas a la fecha



* Los dominios extracelulares se desprenden

Figura 4. Estructura de las dos clases de mucinas: secretadas y asociadas a membrana.

Adaptado de: Argüeso P et al, 2001. *Experimental Eye Research*, Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function, 73: 281–289.

Mucinas secretadas

De las siete mucinas identificadas, cinco son llamadas formadoras de gel. Las mucinas formadoras de gel, son grandes glicoproteínas con dominios ricos en cisteína, en sus N y C terminales, lo que resulta en grandes polímeros que producen un moco viscoso. Éstas son secretadas por las células caliciformes en todas las superficies epiteliales húmedas del cuerpo, y se mueven en ellas, por los varios mecanismos, incluyendo el movimiento de los cilios traqueales, peristalsis, o, en el caso de la superficie ocular, por el movimiento de los párpados; para limpiar la superficie de partículas extrañas. El carácter hidrofílico de las mucinas secretadas, ayuda a sostener los líquidos en superficies epiteliales.

Adicionalmente se han identificado dos pequeños mucinas secretados, MUC7 y -9- que carecen de dominios ricos en cisteína, y se ha demostrado que la MUC7 tiene actividad antimicrobiana (Situ H, 2003).

Mucinas asociadas a membrana

Se han identificado diez. Todas tienen una cola citoplasmática corta y un solo dominio transmembrana, y la mayoría tienen un gran dominio extracelular glicosilado, que se extiende más de 500 nm dentro del glicocalyx. Todas las superficies epiteliales húmedas secretan muchas de éstas mucinas. Ellas parecen contribuir como una barrera hidrofílica de la superficie epitelial, y cada una tiene una función específica adicional (Hollingsworth MA, 2004). Dentro de este grupo se encuentran la MUC1 y -4, que tienen capacidad de señalización a través de su cola citoplásmica y el dominio extracelular similar al Factor de Crecimiento Epidermal, respectivamente (Hollingsworth MA, 2004). La MUC16 tiene el dominio extracelular más grande de las mucinas asociadas a membrana.

Se sabe (Gipson *et al.*, 1996) que el epitelio corneal y conjuntival forma MUC1, que el epitelio conjuntival expresa MUC4, y que las células caliciformes conjuntivales expresan MUC7 y MUC5AC. La MUC1, de acuerdo a Sack *et al.* 1996, es similar a la encontrada en la saliva, y se localiza en la membrana citoplásmica de las células epiteliales aumentando en abundancia desde el polo basal al apical de la célula. Esta mucina disminuye la capacidad de los microorganismos para adherirse al epitelio y es la última línea de defensa contra las proteasas de estos microorganismos (Murube, 1997).

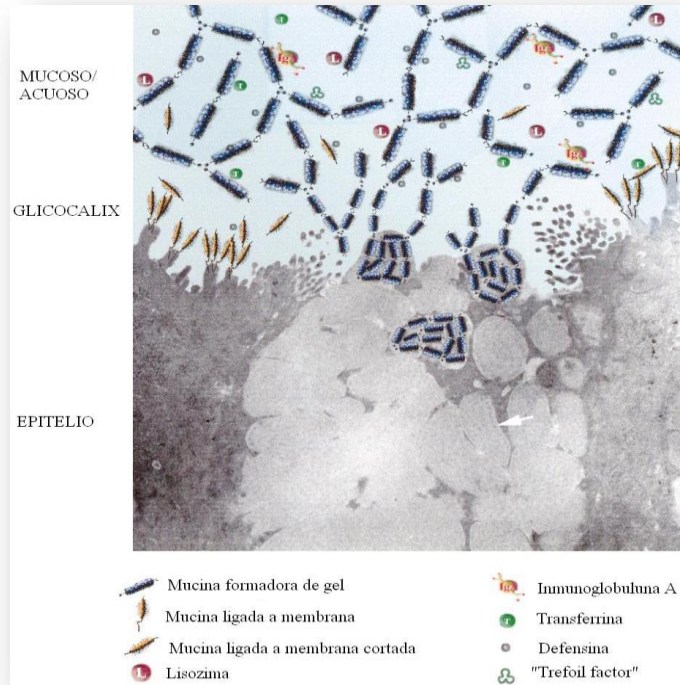


Figura 5. Esquema célula caliciforme. Adaptado de: Gipson I.K. Distribution of mucins at the ocular surface *Experimental Eye Research*. (2004).

Función de la mucina

1. Formar una capa protectora húmeda sobre el epitelio, debido a su capacidad de ligarse al agua y de retenerla, para garantizar así la humectación y el aporte de proteínas, electrolitos y enzimas para las funciones de defensa y mantenimiento del epitelio corneal.
2. Disminuir la tensión superficial del componente acuoso de la lágrima, y favorecer que ésta se extienda sobre la superficie corneal y conjuntival. Lubricar la córnea para facilitar el deslizamiento palpebral.
3. Atrapar microorganismos y cuerpos extraños y arrastrarlos hacia el lago lacrimal, previniendo así infecciones superficiales.
4. Degradar algunos componentes lacrimales, especialmente los lípidos.

5. Proveer un microambiente facilitador de funciones como la actividad neutralizadora de anticuerpos, defensinas, lisozima, transferrina y el “trefoil factor” (Chen, 1997; Tseng, 1997; McClellan, 1997; Murube, 1997).

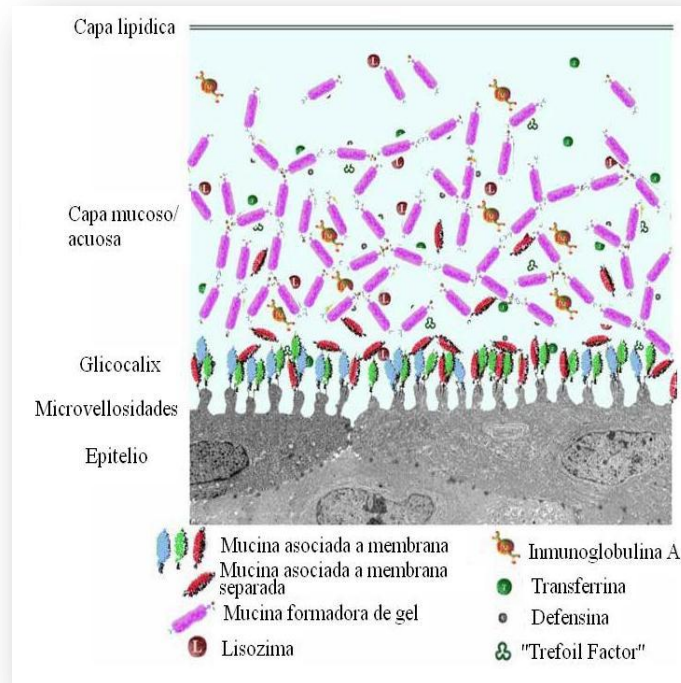


Figura 6. La película lagrimal. Adaptado de: Gipson I.K. Distribution of mucins at the ocular surface *Experimental Eye Research*. (2004).

Cantidad de mucina conjuntival

La población de células caliciformes de un ojo es de 1.5 millones, y su volumen global de 2.2 μL . Como una célula caliciforme segrega al día una cantidad de mucina aproximadamente igual a su volumen, se supone que la secreción de mucina de cada ojo es aproximadamente de 2-3 $\mu\text{L/día}$ (Ehlers et al 1972).

3.2 LESIONES DE LA SUPERFICIE OCULAR

En cualquier patología que afecte la superficie ocular es crucial evaluar el compromiso de los epitelios corneal y conjuntival, pues esto nos dará el pronóstico de recuperación de cada paciente (Biber *et al.*, 2010); sin importar la lesión epitelial corneal existente se puede considerar que la recuperación de este epitelio será completa siempre y cuando se mantengan indemnes un número adecuado de células madre limbares, éstas células se encuentran a nivel del limbo esclerocorneal en un área conocida como palisadas de Vogt, y desde allí se desplazan en sentido centripeto para regenerar el epitelio o cerrar heridas del mismo.

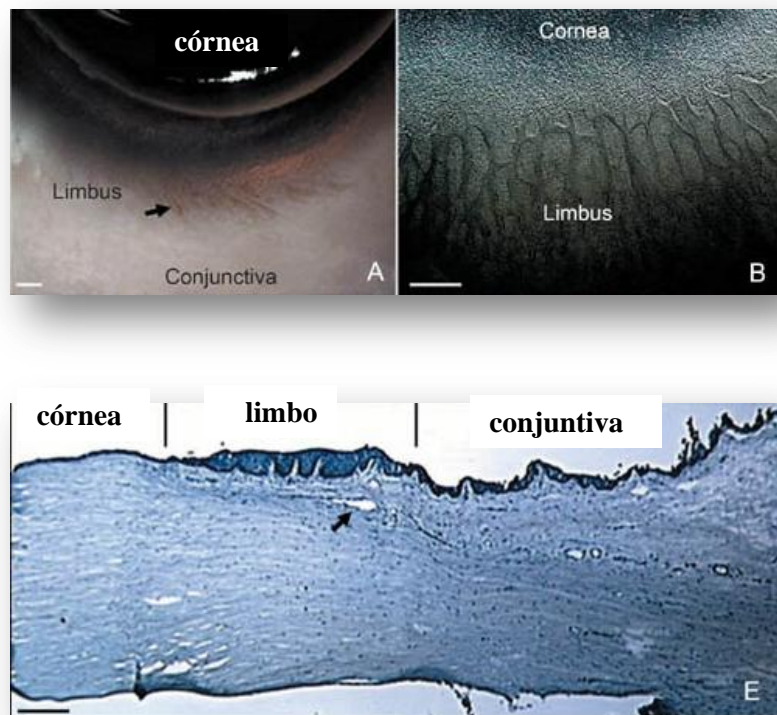


Figura 7. Palisadas de Vogt en limbo. En A se observa la ubicación macroscópica del imbo esclerocorneal y señaladas por la flecha las palisadas de Vogt ligeramente pigmentadas. En B se aprecia un acercamiento de las palisadas donde observamos que se trata de un área con irregularidades de relieve las que se confirma en el corte histológico (E) Adaptado de: Li W. et al. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at limbus. *Cell Research*. (2007).

Biber et al., en 2010 publicó una clasificación para las lesiones de superficie ocular tanto agudas como crónicas basado en el estado de la conjuntiva y las células madre limbares.

	Estadio “a” Conjuntiva normal	Estadio “b” Conjuntiva previamente inflamada	Estadio “c” Conjuntiva inflamada
Estadio I Deficiencia de células madre parcial	Estadio Ia Iatrogenia NIC Asociado a lentes de contacto	Estadio Ib Historia de lesión química o térmica	Estadio Ic SSJ leve, POC, lesión química reciente
Estadio II Deficiencia total/subtotal de células madre	Estadio IIa Aniridia, Lesión severa por lentes de contacto, Iatrogenia	Estadio IIb Historia de lesión química o térmica severa	Estadio IIc SSJ severo, POC, lesión química o térmica reciente

NIC: Neoplasia intraepitelial conjuntival o corneal, SSJ: Síndrome Stevens-Johnson, POC: Penfigoide ocular cicatricial.

Tabla 2. Clasificación de las enfermedades de la superficie ocular con lesión de células madre limbares. Adaptado de: Biber et al., (2010) Management of ocular stem cell disease. *Int ophthalm clin.*

La superficie ocular, como unidad funcional constituida por la estrecha interacción entre los epitelios corneal y conjuntival y la película lagrimal se puede ver afectada por un extenso número de patologías cuya revisión al detalle no es el objetivo del presente trabajo; mencionaré por tanto algunas generalidades sobre el síndrome de ojo seco y algunas patologías que podrían beneficiarse de los avances en ingeniería de tejidos alcanzados en este trabajo y otros tanto a nivel nacional como mundial.

3.2.1. Síndrome de ojo seco o queratoconjuntivitis lacrimal

Se define como una alteración multifactorial de la Unidad Funcional Lagrimal con resultado de síntomas de molestias (discomfort) y alteración de la agudeza visual, y como hecho fisiopatológico, establece la inestabilidad de la película lagrimal, el aumento de la osmolaridad y la inflamación (Dry Eye Workshop, 2007).

3.2.2. Síndrome de Sjögren

Enfermedad autoinmune caracterizada por infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas con la consecuente disfunción de glándulas salivares y lagrimales, resultando en un síndrome sicca; la superficie ocular está igualmente afectada por infiltrados linfocíticos en conjuntiva y apoptosis de las células epiteliales. Múltiples citoquinas como las Interleuquinas (IL) 1, 6 y 8 además de los factores de necrosis tumoral α (FNT- α) y factor transformante del crecimiento β (FTC- β) se han identificado en las lágrimas de estos pacientes, por lo que se ha postulado que puedan tener algún papel en la patogénesis de la alteración a nivel de la superficie ocular. (Aragona P, *et al.*, 2006)

3.2.3. Deficiencia de Vitamina A

La Vitamina A es esencial para la síntesis de RNA y glicoproteínas por parte de las células epiteliales conjuntivales, dicha síntesis ayuda a mantener la mucosa conjuntival y el estroma corneal. En pacientes con deficiencia severa de Vitamina A, la cornea se somete a un proceso de metaplasia escamosa con queratinización. Una queratitis punteada fina en cuadrante inferonasal es el signo inicial, para luego extenderse por toda la córnea, la córnea desarrolla un aspecto de piel de naranja con placas xeróticas y pérdida del epitelio. En deficiencias más severas, infiltrados estromales necrotizantes pueden aparecer desarrollando úlceras corneales que sin tratamiento pueden progresar a queratomalacia (derretimiento corneano) (Collins CE y Koay P, 2010)

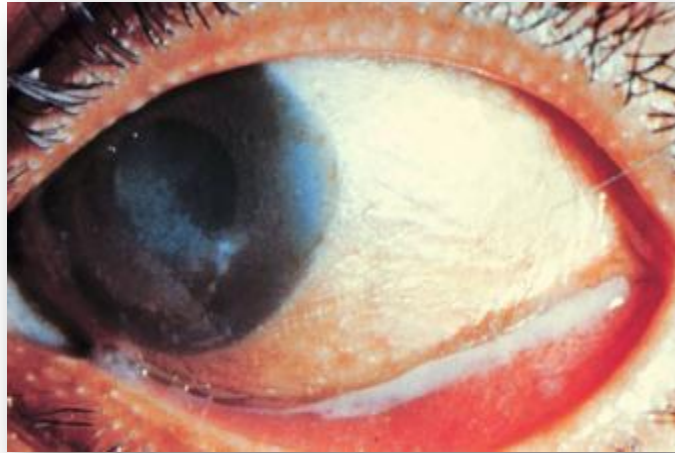


Figura 8. Xeroftalmía por Avitaminosis A. Adaptado de: Ojo seco, Tomo I/Anatomía y fisiología/J. Murube/Tecnómica Editorial, 1997.

3.2.4. Síndrome de Stevens-Johnson.

Se define como un eritema multiforme vesiculo-buloso de la piel y otros órganos. Es considerado como etapa inicial de una reacción dérmica cuya presentación más severa es la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET), una condición inflamatoria sistémica aguda que involucra piel y mucosas en más de 30% de superficie corporal. Su etiología está ligada al uso de algunos fármacos en 60% de los casos, además de infecciones por virus de herpes simple, micoplasma y algunos factores genéticos predisponentes (Murube, 1997).

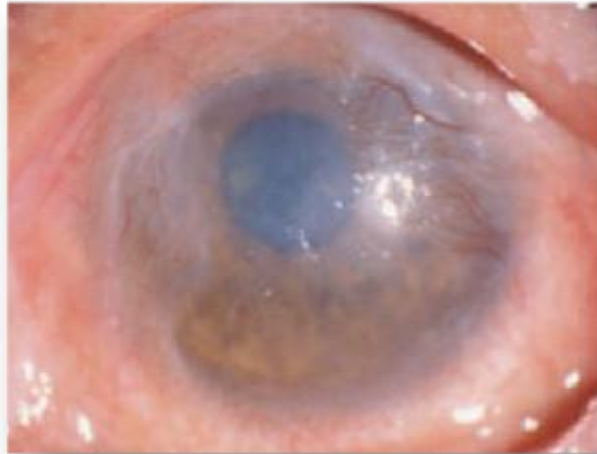


Figura 9. Secuelas oculares de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson. Adaptado de: Inatomi et al, *Cornea* 2005; 24(Suppl. 1):S32–S38

3.2.5. Penfigoide ocular

Es una enfermedad sistémica de origen desconocido pero presumiblemente autoinmune, caracterizada por cicatrización conjuntival con fibrosis subepitelial y formación de simbléfaron con acortamiento de los fondos de saco conjuntivales (Faraj HG, y Hoang-Xuan T, 2001; Quintana R, 2004).

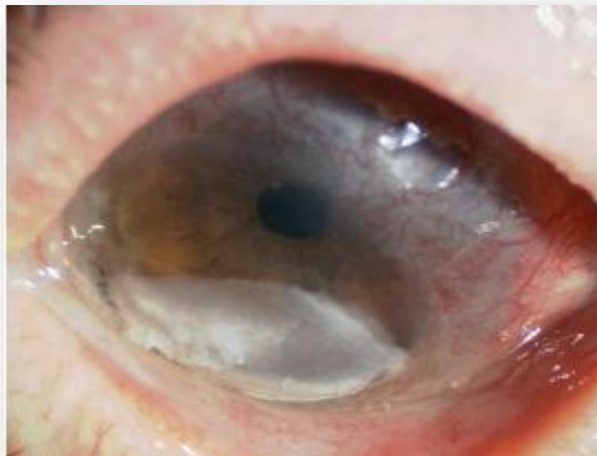


Figura 10. Secuelas oculares de un paciente con Penfigoide ocular. Adaptado de: Inatomi et al., *Cornea* 2005; 24(Suppl. 1):S32–S38

3.2.6. Quemaduras químicas o térmicas

Las quemaduras representan un trauma ocular por agente químico, que puede estar asociado o no con trauma mecánico. Afectan con mayor frecuencia el grupo de edad entre 20 y 40 años, con mayor riesgo para el sexo masculino. El 61% ocurre como accidentes industriales y el 37% en el hogar. Éstas pueden ser originadas por dos tipos de agentes: ácidos o álcalis. Las lesiones por ácidos afectan la superficie ocular y generalmente se detienen al combinarse con las proteínas de la córnea, por lo que su daño es limitado. Los álcalis pueden atravesar la córnea y llegar al iris, cristalino y estructuras internas, por lo que el daño que ocasionan es mayor. Los ácidos dañan al ojo en el momento del contacto; los álcalis continúan dañando mientras no sean retirados del ojo. De los ojos que sufren una lesión por álcalis severa, sólo aproximadamente el 50% presentará algún grado de mejoría visual con el tratamiento (Ralph, 1998; Lima, 2002).



Figura 11. Secuelas oculares de una lesión química. Adaptado de: Inatomi *et al.*, *Cornea* 2005; 24(Suppl. 1):S32–S38

Finalmente, secundario a éstas patologías, ocurre un daño en el estroma conjuntival que subyace el epitelio, el cual conduce a un proceso reparativo caracterizado por contracción y formación de cicatrices extensas que disminuyen la superficie de la conjuntiva. Cuando esto ocurre pueden presentarse condiciones patológicas que demanden injertar tejido (Cordeiro *et al.*, 1997). Los autoinjertos de conjuntiva pueden verse limitados por la disponibilidad de tejido donante; por esta razón, se han utilizado diferentes tipos de mucosa natural, autóloga u homóloga, y también membrana amniótica, en la reconstrucción de la conjuntiva, con pobres resultados (Karesh JW *et al.*, 1988; Fry TL *et al.*, 1987; Tseng SC., *et al.*, 1997). Esto conduce no sólo a lesiones de la conjuntiva, sino también de la córnea (Aragona *et al.*, 2006). Por esta razón, en ciertos casos los trasplantes de córnea, fracasan y no logran evitar la pérdida funcional de la visión (Panda A, 2007).

3.3 ESTADO DEL ARTE

En la actualidad existen diversas alternativas para el manejo de la patología de superficie ocular, transplante queratolimbar autólogo (Kenyon KR and Tseng SC., 1989), transplante limbar de pariente cercano (Biber JM., *et al.*, 2010), los aloinjertos en general proporcionados por un banco de ojos (Biber JM., *et al.*, 2010), trasplantes de membrana amniótica (Tseng SC., *et al.*, 1997) o uso de células madres epiteliales cultivadas a partir de limbo corneal u otras fuentes como mucosa oral (Fry TL and Woods Cl., 1987) que han sido usadas procurando la restauración de una superficie ocular lesionada. Cada una de esas diferentes técnicas tiene sus propias indicaciones, contraindicaciones y limitaciones, por ejemplo, en todos los casos de aloinjertos se requiere inmunosupresión sistémica que puede acarrear efectos secundarios capaces de poner en riesgo la vida del paciente; los autoinjertos de conjuntiva por su parte aunque no requieren inmunosupresión sistémica pueden no estar disponibles en todos los pacientes (Biber JM., *et al.*, 2010). Además, antes de realizarse la restauración de la

superficie ocular se debe asegurar un ambiente adecuado, esto significa la optimización de la función del parpadeo y la recuperación de los fornices, así como asegurar una lubricación adecuada de toda la superficie ocular (Schrader S., *et al.*, 2009). En este campo la ingeniería de tejidos está emergiendo como una posible alternativa a las ya mencionadas.

Los primeros sustitutos oculares obtenidos por ingeniería de tejidos fueron corneales. Pellegrini y colaboradores (1997) fueron los primeros en demostrar la aplicación clínica de injertos de láminas epiteliales cultivadas, luego de lo cual diferentes técnicas de cultivo celular y soportes han sido evaluados en la construcción de sustitutos con funcionalidad clínica en el tratamiento de lesiones de la córnea (Koizumi N *et al.*, 2001; Nakamura T *et al.*, 2004). Mayor información sobre reconstrucción de la superficie ocular empleando injertos de epitelios mucosos cultivados, se encuentra en una revisión elaborada por Inatomi T y colaboradores (2005).

El cultivo *in vitro* de cualquier epitelio y su diferenciación se ven favorecidos por la presencia de tejido estromal, natural o sintético, sembrado o no con células (Butler C *et al.*, 2002). El co-cultivo de epitelio con fibroblastos en la interfase aire-líquido ha permitido la obtención de láminas epiteliales que se han trasplantado en corneas lesionadas (Inatomi T *et al.*, 2005). Esta técnica también se ha empleado para elaborar sustitutos de tejido conjuntivo. Lee SY *et al.* (2003) estudiaron el efecto que tiene injertar soportes de ácidos poliláctico-poliglicólico, sembrados con fibroblastos estromales y células epiteliales, en la contracción y la cicatrización de lesiones de la conjuntiva de conejos. Los resultados de estos autores muestran que las heridas conjuntivales, injertadas con los soportes sembrados con células, epitelizan completamente y se produce una disminución en la formación de cicatrices y en la contracción.

Desde hace más de 20 años se han empleado soportes de colágeno en la manufactura de injertos artificiales para la superficie ocular (Geggel HS *et al.*,

1985; Hsu W-C *et al.*, 2000) demostraron que un soporte acelular constituido por un copolímero de colágeno y glicosaminoglicano (CG) reduce drásticamente la contracción de la herida y promueve la síntesis de tejido estromal en una lesión de espesor total. .

Cultivos de células caliciformes han sido obtenidos a partir de células provenientes de modelo animal. Un método para aislamiento y cultivo primario de células caliciformes aisladas de la conjuntiva de rata fue reportado por Shatos MA y colaboradores (2001). Estos autores lograron hacer sub-cultivos de las células aisladas sin que estas perdieran marcadores celulares característicos de los tejidos vivos. La caracterización de las células caliciformes se hizo mediante detección de citoqueratina CK-7, lectinas y MUC5AC.

Nuestro grupo tiene establecida la metodología para producir soportes de colágeno tipo I, que han mostrado servir como soportes del crecimiento de fibroblastos aislados de conectivo de mucosa oral y piel (Pérez S *et al.*, 2001). En un trabajo previo (Triana, 2004) se aislaron y cultivaron células de córnea de conejo, mostrando que es posible investigar en el desarrollo de sustitutos de tejidos oculares.

En definitiva todas las patologías que comprometen de forma severa la superficie ocular y causan déficit visual, requieren de nuevas tecnologías que permitan la reconstrucción de todos sus componentes, restaurar su funcionalidad y mejorar el microambiente para hacer posibles procedimientos que busquen mejorar la calidad visual del paciente y que no estén limitados por la poca disponibilidad de tejido en compromisos bilaterales, significativos efectos adversos secundarios a terapias medicamentosas crónicas y transmisión de infecciones, como en los trasplantes de córnea (Panda A, 2007).

Explorar las opciones terapéuticas fundamentadas en estos campos, con el propósito de reconstruir zonas de la conjuntiva en las que las células caliciformes se encuentren afectadas, puede ser una opción para mejorar el microambiente del segmento anterior y así hacer apto al paciente para procedimientos que mejoren su calidad visual. Es por esto que este trabajo busca establecer fundamentos que permitan iniciar el desarrollo de sustitutos de conjuntiva artificiales que puedan ser aplicados en humanos. En el proceso se generarán las propuestas investigativas que permitan la formación y consolidación de un grupo dedicado a la elaboración de sustitutos de tejidos oculares en la Unidad de Oftalmología y el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Así de manera activa estaremos contribuyendo con la iniciativa global de la OMS de eliminar la ceguera en el 2020.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Establecer un co-cultivo de fibroblastos, queratinocitos y células caliciformes, aisladas de conjuntiva de conejos, en soportes de colágeno tipo I.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estandarizar el co-cultivo de fibroblastos, queratinocitos y células caliciformes provenientes de conjuntiva de conejos en soportes de colágeno tipo I.
- Realizar la caracterización morfológica, histoquímica e inmunohistoquímica de los co-cultivos desarrollados.

5. DISPOSICIONES VIGENTES

La presente investigación no presenta dilemas éticos en ninguna de sus acciones o procedimientos. En el diseño de los experimentos se buscó minimizar al máximo el sacrificio de animales. La manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos internacionales: *National Institutes of Health* (NIH), *National Association for Biomedical Research* (NABR) y *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) y Nacionales (Artículo 11 de la Resolución nº 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989) con el fin de minimizar el sufrimiento animal. Para tomar las biopsias, los animales fueron llevados a la sala de eutanasia del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional. Allí, se inmovilizaron para la aplicación intravenosa del agente anestésico en una solución concentrada de anestésicos no inhalantes tipo barbitúricos, a nivel de la vena marginal de la oreja. A continuación, se verificaron los signos vitales para comprobar la muerte y posteriormente se obtuvieron las muestras de tejido ocular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron: Fenobarbital sódico y difenilhidantoina sódica, medio de cultivo Dulbecco`s modified Eagle`s médium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB), medio de cultivo para queratinocitos libre de suero fetal (K-SFM), solución balanceada de Hank, L-glutamina y penicilina-estreptomina, anfotericina B, solución tripsina-EDTA, mitomicina C; frascos de cultivo Falcon, tubos Falcon (15 y 50 ml), pipetas, laminillas, tinciones Hematoxilina-Eosina y ácido periódico-Schiff (PAS), anticuerpos monoclonales anti-CK7 y anti-Vimentina.

6.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La obtención de los cultivos primarios y subcultivos tanto de fibroblastos como de queratinocitos se realizó siguiendo la metodología usada por Vasquez AC, et al. 2009; introduciendo modificaciones a medida que el proyecto las fue requiriendo.

Se obtuvieron biopsias de conjuntiva de conejos Nueva Zelanda, provenientes de una granja de cunicultura, de aproximadamente 3 a 6 semanas de vida, con pesos entre 600 y 1.200 g, los cuales fueron sacrificados en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. La eutanasia se practicó mediante la inyección de una mezcla de fenobarbital sódico y difenilhidantoina sódica (Eutanex®), 390 y 50 mg/kg respectivamente, en la vena marginal de la oreja. Se realizó profilaxis antimicrobiana con moxifloxacina al 0.5% colirio, una gota cada 5 minutos, 30 minutos previo a la eutanasia y antes de la toma del tejido.

Bajo condiciones de asepsia y antisepsia, con ayuda de pinzas .12 y tijeras de Westcott estériles, se realizó la toma del tejido conjuntival superficial, bajo estereoscopio a fin de aislar en lo posible el epitelio conjuntival y posteriormente del tejido conjuntival más profundo junto con la cápsula de Tenon. Las muestras fueron transportadas en tubos Falcon 15 ml (Becton Dickinson Labware NJ, USA), con solución balanceada de Hank suplementada con penicilina-estreptomina (100 u/ml, 100 µg/ml) (Gibco ®, Grand Island, NY, USA) y anfotericina (25 µg/ml) (ICN, Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA).

Una vez en el laboratorio bajo condiciones asépticas, en cabina de flujo laminar vertical, el tejido fue lavado con buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) y suplementado con penicilina-estreptomina (100 u/ml, 100 µg/ml) para retirar mecánicamente restos hemáticos y tejidos contaminantes. Posteriormente se lavaron de nuevo con PBS suplementado con antibióticos como ya se mencionó, a intervalos de 20 minutos a 37°C, en tres ocasiones, con el fin de eliminar la contaminación microbiana. Una vez transcurrido este tiempo, se procesaron de acuerdo al tipo celular requerido.

6.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES

Para el aislamiento y cultivo de células epiteliales se probó inicialmente el método de explantes (Vásquez AC, et al., 2009). Se obtuvieron capas de tejido conjuntival que fueron extendidas sobre las cajas de cultivo de 5.5cm² y posteriormente se realizaron cortes con ayuda del bisturí, para obtener explantes de 1mm². Una vez adheridos al plato de cultivo, se agregaron 5 ml de medio de cultivo K-SFM, suplementado más anfotericina B 25 µg/ml, penicilina/estreptomina 100 UI y 100 µg/ml respectivamente. Las cajas fueron incubadas en atmósfera húmeda (5% de CO₂) a 37°C, hasta obtener una monocapa de células. El medio se cambió dos veces por semana. Una vez se obtuvieron cultivos con confluencia mayor al 80%,

se realizaron pasajes para ampliar la población celular. A medida que se reconocieron dificultades en la obtención de las células epiteliales, el procedimiento descrito se modificó.

Luego se usó el método de disgregación enzimática sobre capa alimentadora de fibroblastos tratados con mitomicina C (MTC) siguiendo los lineamientos del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares de la Universidad de Antioquia (Arango 2009) con algunas modificaciones. Brevemente, una vez obtenidas las biopsias de epitelio conjuntival estas eran lavadas con mezcla de PBS y antibióticos tal como se describió, acto seguido el tejido era cortado con tijera en presencia de Tripsina/EDTA (Gibco®, Grand Island, NY, USA) 0,05% se sumergían los fragmentos en 10cc Tripsina/EDTA se dejaban en agitación durante 30 min a 37°C a velocidad media, el contenido era entonces pasado por un filtro (cell strainer) de 0.70µm. La solución resultante era inactivada con PBS más SFB 5%, dicha mezcla se centrifugaba a 1500rpm (Beckman, J2-MC) durante 10 min para luego resuspender el pellet en 2 cc de K-SFM, realizar conteo celular y sembrar las células obtenidas en caja de 6 pozos preparados con capa alimentadora, a una densidad de 200.000 células por pozo.

Las capas alimentadoras se obtenían a partir de células de la línea celular murina 3T3-Swiss sembradas en la caja de 6 pozos, al observarse confluencia se les aplicó Mitomicina C (MTC, Laboratorio Evolucia S.A.S Polvo Liofilizado Fraccionado, Bogotá, Colombia) 0,01mg/mL durante 4 horas a 37°C para inactivarlos y sembrar en ellos los queratinocitos obtenidos a partir de el proceso de disgregación enzimática.

Posteriormente se modificó nuevamente el procedimiento usando la técnica de explantes sobre una capa de fibrina; para esto se tomaron muestras de sangre total humana (aprox 10 cc, donantes humanos voluntarios informados sobre el procedimiento y sus posibles riesgos) en tubos con citrato de sodio al 3.8% se procedió a centrifugar esas muestras por 10 min a 1800rpm. El sobrenadante fue

retirado asegurándose de tomar únicamente el plasma total, y se procedió a realizar la elaboración del coagulo de fibrina en placas de cultivo de 6 pozos siguiendo las especificaciones del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares de la Universidad de Antioquia (Arango 2009). Sobre esta fibrina se procedió a sembrar explantes de conjuntiva y células obtenidas mediante el proceso de disgregación enzimática mencionado arriba en cuyo caso la capa de fibrina reemplazaba la capa alimentadora.

Subcultivos o pasajes: Una vez se obtuvieron cultivos confluentes, se retiró el medio y se lavaron las cajas con PBS. Posteriormente se adicionó a la caja 1 ml de la mezcla de tripsina al 0.025% y EDTA (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) al 0.02 %. Las mezclas se dejaron actuar hasta observar desprendimiento celular (aproximadamente 10 minutos), y luego se inactivó su acción con 1 ml de DMEM suplementado al 10% con SFB. La suspensión obtenida se centrifugó a 1200 rpm (Beckman, J2-MC) por 10 minutos y los *pellets* obtenidos se resuspendieron independientemente en 1 ml de DMEM suplementado, para ser distribuidos en 2 nuevos frascos de cultivos (Watt, 1998). Este procedimiento fue aplicado también a los métodos de capa alimentadora con fibroblastos 3T3 tratados con MTC y al de capa de fibrina, manteniendo en cada caso el protocolo de base de la técnica; es decir, se usó una nueva capa de células fibroblastos 3T3 en cada nueva caja y un nuevo coagulo de fibrina en cada nueva caja.

6.4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Para este tipo celular se siguió el procedimiento referido por Vásquez et al., 2009, sin mayores modificaciones. Una vez se obtuvo la porción superficial de la conjuntiva, se tomó la porción profunda junto con la capsula de Tenon. Posterior a los lavados con PBS, se realizaron cortes del tejido conectivo aislado, de

aproximadamente 1 mm^2 , se colocaron en el frasco de cultivo de 25 cm^2 a una distancia de 0.5 cm entre ellos, se dejaron secar por 30 minutos y una vez adheridos al plato se añadieron 5mL de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Gibco®, Grand Island, NY, USA), suplementados con aminoácidos no esenciales, vitaminas y piruvato de sodio todos al 1%, anfotericina B 25 $\mu\text{g/ml}$, penicilina/estreptomicina 100 UI y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente y suero fetal bovino al 10%. Se incubó a 37°C y 5% CO_2 hasta obtener una monocapa de fibroblastos confluentes. El medio se cambió dos veces por semana.

Subcultivos o pasajes: Para los subcultivos de fibroblastos se realizó el mismo procedimiento que para la células epiteliales utilizando la mezcla de tripsina y EDTA, 0.25% y 0.02%, respectivamente; la cual se dejó actuar por solo 10 minutos.

6.5. OBTENCIÓN DE LOS SOPORTES DE COLAGENO TIPO I

Se hizo una modificación de un procedimiento desarrollado en nuestro grupo de trabajo (Pérez et al., 2001), para obtener colágeno a partir de fascia de bovino, la cual se limpió y cortó en pedazos pequeños, que se sumergieron en ácido acético 0.01M y se mantuvieron a 4°C hasta disolución. Después se procedió a precipitar el colágeno con NaOH 0,1 N. El precipitado se lavó con PBS y después de liofilizado se disolvió hasta una concentración de 2 mg/ml (determinada mediante espectroscopia UV). La solución de colágeno obtenida se analizó mediante SDS-PAGE y después de comprobar su pureza, se entrecruzó usando diferentes concentraciones de solución de glutaraldehído en ácido acético 0.05M. Para obtener mallas, el colágeno fue liofilizado, luego cortado en fragmentos de 2 cm^2 y esterilizado con óxido de etileno y almacenado a temperatura ambiente, hasta su uso.

6.6 OBTENCIÓN DEL COCULTIVO

Los soportes de colágeno tipo I obtenidos mediante el protocolo ya enunciado sección 6.5, cortados en áreas de 2 mm² y esterilizados fueron sumergidos en DMEM al 20% SFB durante una noche en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente se tomaron las cajas de 3 ó 4 pasajes con fibroblastos y se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se les aplicó la mezcla de tripsina al 0.025% y EDTA al 0.02 % (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Las mezclas se dejaron actuar hasta observar desprendimiento celular (aproximadamente 10 minutos), y luego se inactivó su acción con DMEM suplementado al 10% con SFB. La suspensión obtenida se centrifugó a 1200 rpm (Beckman, J2-MC) por 10 minutos y los *pellets* obtenidos se resuspendieron en DMEM (Gibco®, Grand Island, NY, USA), suplementados con aminoácidos no esenciales, vitaminas y piruvato de sodio todos al 1%, anfotericina B 25 µg/ml, penicilina/estreptomicina 100 UI y 100 µg/ml, respectivamente y suero fetal bovino al 10%. Esta mezcla fue adicionada a los soportes de colágeno ya preparados, luego se incubaron a 37°C y 5% CO₂. El medio se cambió dos veces por semana hasta que los cultivos de queratinocitos alcanzaran la confluencia para ser sembrados sobre los soportes con fibroblastos, en general mínimo 3 semanas y máximo 8 semanas. Para sembrar los queratinocitos se usaron dos técnicas, en la primera, se retiró el medio y se lavaron las cajas con PBS. Posteriormente se adicionó a la caja 1 ml de la mezcla de tripsina al 0.025% y EDTA (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) al 0.02 %. Las mezclas se dejaron actuar hasta observar desprendimiento celular (aproximadamente 10 minutos), y luego se inactivó su acción con 1 ml de DMEM suplementado. La suspensión obtenida se centrifugó a 1200 rpm (Beckman, J2-MC) por 10 minutos y los *pellets* obtenidos se resuspendieron en K-SFM y se sembraron sobre los soportes. El medio se cambio dos veces por semana, centrifugando el medio antes de desecharlo cuando se observaban células viables que no se habían fijado a la superficie del soporte, los soportes se fijaron en formaldehído al 10% en PBS a 4°C durante mínimo 2 días y se llevaron para

procesamiento de histología, histoquímica e inmunohistoquímica en laboratorio de patología interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

La segunda técnica usada consistió en retirar el medio, lavar las cajas con PBS. Posteriormente adicionar a la caja 1 ml de dispasa (Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 0.5% por 40 minutos a 37° C, con el fin de separar la monocapa de células epiteliales y posteriormente se procuró ubicar la monocapa sobre el área central del soporte de colágeno con fibroblastos; se aplicó K-SFM hasta cubrir por completo los soportes, el medio se cambio dos veces por semana durante tres semanas para luego dejar los soportes en una interface aire-liquido buscando la estratificación del epitelio durante 14 días, los soportes se fijaron en formaldehido al 10% en PBS a 4°C durante mínimo 2 días y se llevaron para procesamiento de histología, histoquímica e inmunohistoquímica en laboratorio de patología interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

7. RESULTADOS

7.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES

Con el método estandarizado por Vásquez AC et al., de la inyección subconjuntival de aire, para obtener tejido conjuntival superficial, se obtuvieron monocapas confluentes de queratinocitos con mínima contaminación por fibroblastos o ausencia de la misma.

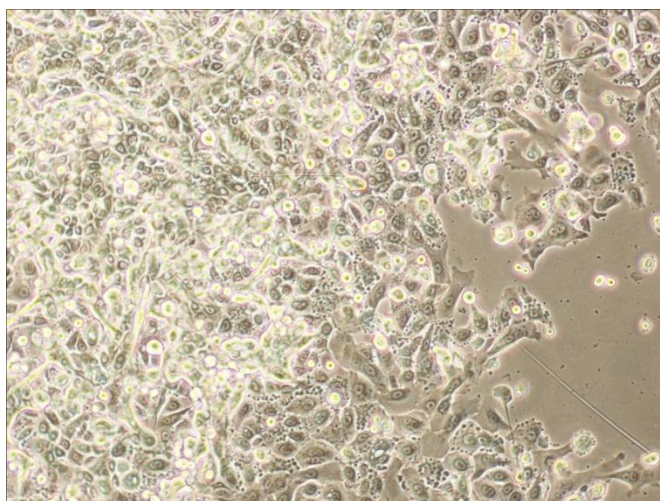


Figura 12. Monocapa de queratinocitos cultivados. Se observa monocapa de queratinocitos al día 20 de su cultivo con la técnica implementada por Vásquez et al. 2009. Aumento 10x.

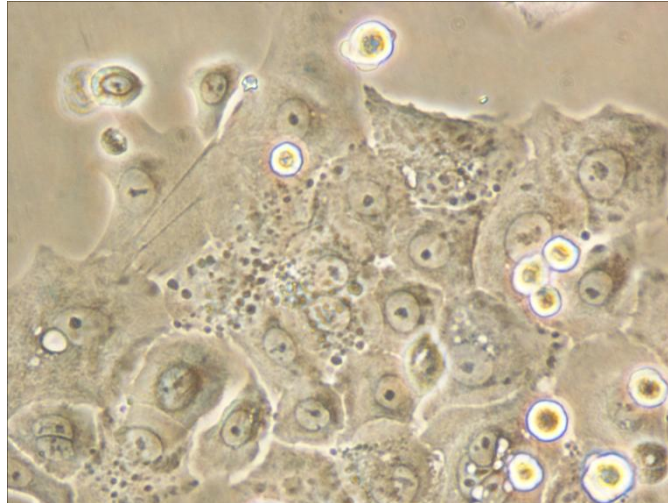


Figura 13. Monocapa de queratinocitos cultivados. Imagen ampliada del cultivo de la figura anterior. Se observa con detalle la disposición en empedrado y algunos gránulos intracitoplasmáticos que podrían corresponder a gránulos de mucina. Aumento 40x.

El método de capa alimentadora sobre fibroblastos 3T3 fue efectivo por cuanto permitió el crecimiento de una monocapa de queratinocitos sin contaminación por fibroblastos a partir de un número reducido de células epiteliales viables al momento del cultivo, las características microscópicas del cultivo son las mismas a las obtenidas con el método previamente usado; sin embargo no fue posible lograr la ampliación del cultivo pues al realizar el primer pasaje se observó poca adherencia de las células a la capa alimentadora y nunca se logró una confluencia adecuada.

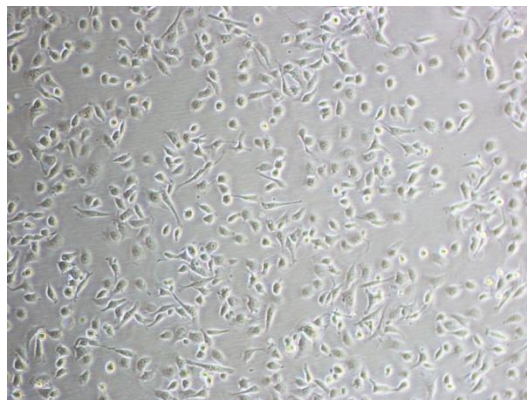


Figura 14. Capa alimentadora de fibroblastos 3T3. Observamos células de aspecto fibroblastoide con una buena confluencia al día 3 de su cultivo. Al llegar al día 5 serán tratadas con Mitomicina C para proceder a sembrar en ellas los queratinocitos obtenidos por disgregación enzimática. Aumento 10x.

La técnica de coágulos de fibrina, permitió obtener una monocapa de células epiteliales con adecuada confluencia al día 15 de cultivo, sin embargo, hacia el día 11 se empezó a observar contaminación con fibroblastos en algunos de los pozos y hacia el día 20 en otros.

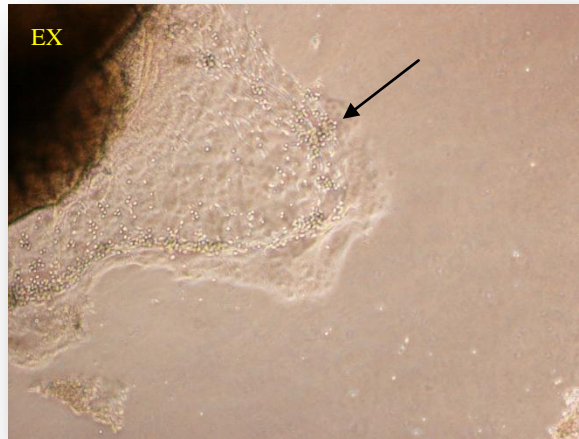


Figura 15. Explantes sobre coagulo de fibrina. EX: Explante de conjuntiva. La flecha indica el área de crecimiento de la monocapa al día 6 en ese explante. Aumento 4x.

Por lo anterior se decidió separar las monocapas en el cultivo primario con Dispasa 0.5% y colocar estas monocapas sobre los soportes de colágeno; dicho procedimiento tuvo una dificultad técnica especial al observarse que las monocapas se plegaba sobre sí mismas por lo que su posicionamiento sobre los soportes fue técnicamente difícil y muy probablemente quedaron algunas áreas plegadas sobre los mismos.

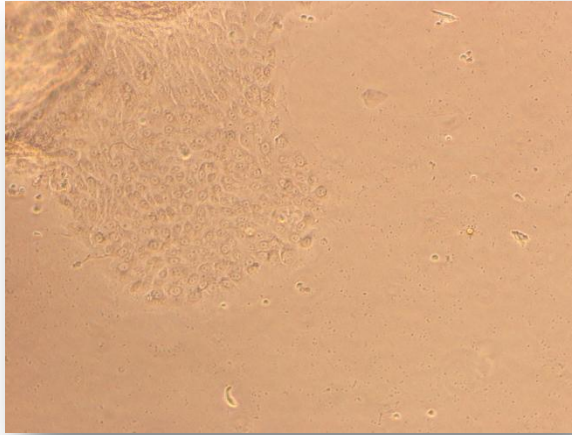


Figura 16. Explantes sobre coagulo de fibrina. Una vista a mayor aumento de otra área de cultivo, se observa un área de células en crecimiento sobre el coagulo de fibrina. Aumento 10x

7.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Siguiendo la metodología planteada y realizada por Vásquez et al. en 2009, se obtuvieron cultivos confluentes de fibroblastos entre los días 6 a 9, los cuales fueron ampliados realizando entre 3 y 4 pasajes antes de sembrarlos en los soportes de colágeno

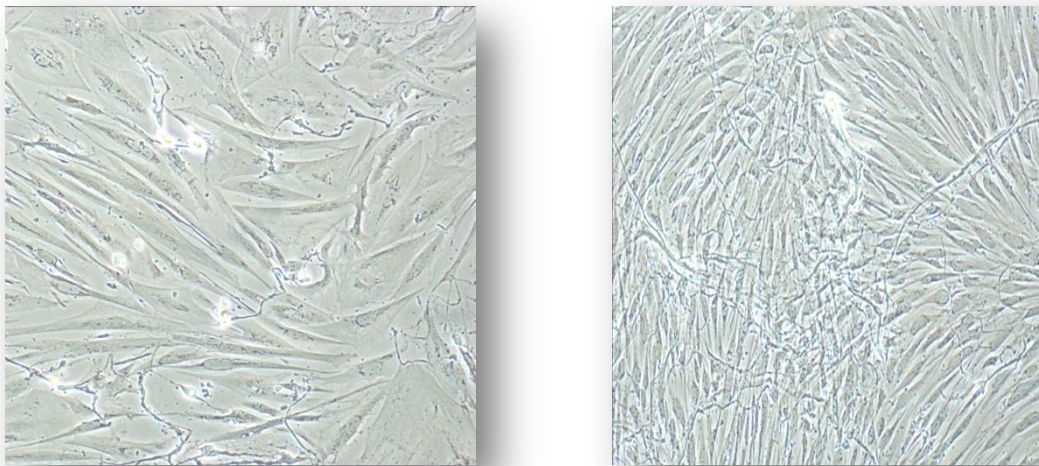


Figura 17. Fibroblastos en cultivo.

7.3. OBTENCIÓN DEL COCULTIVO

El seguimiento del crecimiento celular en los soportes es complejo dada la naturaleza opaca del soporte en si mismo lo que impide ver con claridad la morfología celular como la evidenciábamos en fotos previas. En cada observación en el microscopio de luz invertida se observaba principalmente la ausencia de contaminación biológica y al mover el foco hacia arriba y abajo se podían observar características de algunas células sin poderse definir con claridad si eran estas fibroblastos o queratinocitos.

Otro aspecto que se evaluaba era el consumo del medio de cultivo dado por cambio de color al bajar el pH del mismo por el metabolismo celular; estos parámetros nos daban la impresión que efectivamente había crecimiento celular. En la figura 18 observamos la imagen al microscopio de luz invertida de un cocultivo realizado tripsinizando tanto los fibroblastos como los queratinocitos, mientras en la figura 19 observamos un cocultivo realizado tripsinizando los fibroblastos y luego poniendo la monocapa de queratinocitos sobre el soporte separada mediante el uso de dispasa.

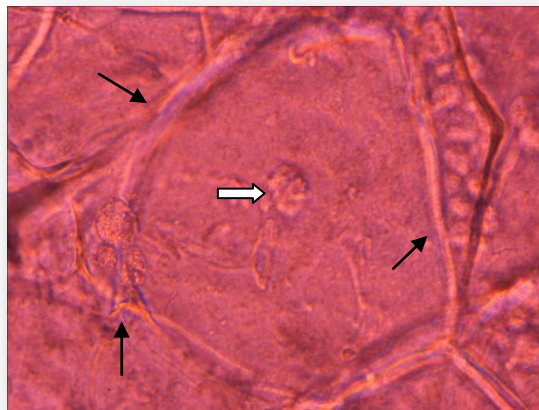


Figura 18. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Día 7. Las flechas negras señalan irregularidades de la superficie del soporte, la flecha blanca muestra el núcleo de una célula sin que sea posible determinar a simple vista si es fibroblasto o queratinocito. Aumento 40x.

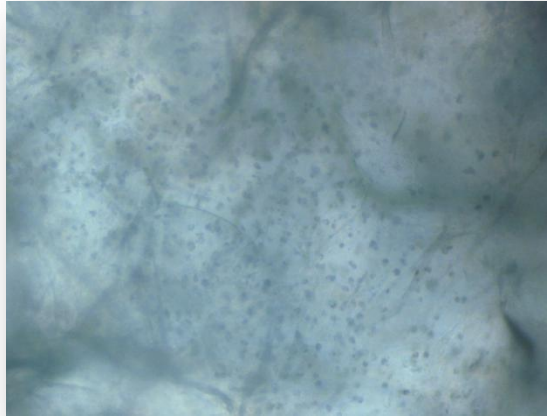


Figura 19. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Día 20. A menor aumento y con enfoque más superficial que la foto anterior se observan menos nítidamente las irregularidades de la superficie del soporte. Se observan también gran número de áreas oscuras compatibles con núcleos celulares por encima de los soportes. Aumento 10x.

7.4. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA- HISTOQUÍMICA.

Los co-cultivos fueron procesados por el laboratorio de patología interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia para su caracterización histológica e histoquímica.

La tinción con hematoxilina-eosina mostró una densidad celular menor a la esperada, con células que tenían características algunas de fibroblastos y otras de queratinocitos adheridos y/o en relación al soporte de colágeno tipo I, sin observarse un patrón anatómico similar al de la conjuntiva sana que era el que se esperaba encontrar.

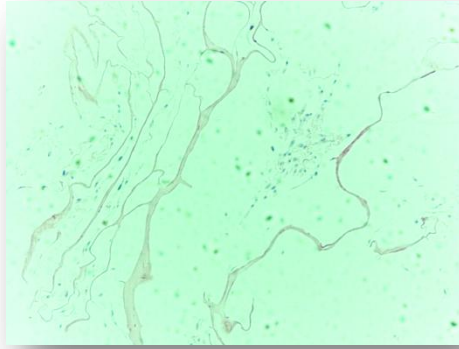


Figura 20. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción H-E. Aumento 10x.

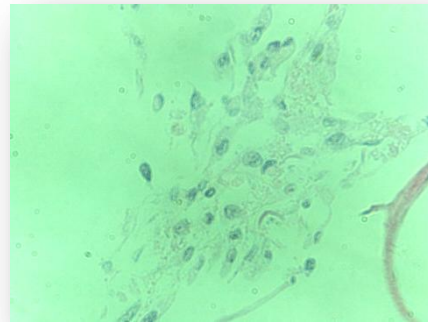
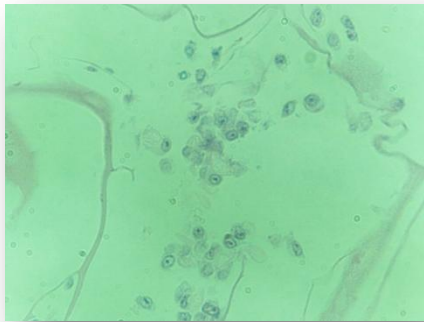


Figura 21. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción H-E. Aumento 40x.

La tinción con PAS demostró la presencia de células con alto contenido glicoproteico compatible con queratinocitos - células caliciformes de conjuntiva. Figura 22.

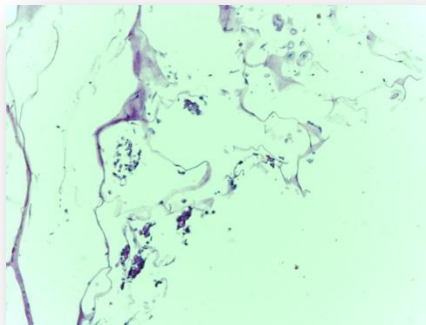


Figura 22. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción PAS. Aumento 10x.

7.5. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.

La caracterización inmunohistoquímica fue igualmente realizada en el laboratorio de Patología interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Se realizaron tinciones con Citoqueratina 7 para identificar células de origen epitelial y con Citoqueratina 7 más Vimentina con el objeto de identificar los dos tipos celulares (los fibroblastos como células de origen mesenquimal presentan tinción positiva con Vimentina) sobre el soporte de colágeno. Con estas tinciones confirmamos los hallazgos que ya se habían identificado con las otras tinciones, a pesar de encontrar los dos tipos celulares adheridos al soporte, no estaban conformando una estructura tridimensional similar a la de la conjuntiva sana, lo cual era el objetivo de este proyecto. Por el contrario se observan formando pequeñas colonias en diferentes áreas del soporte.

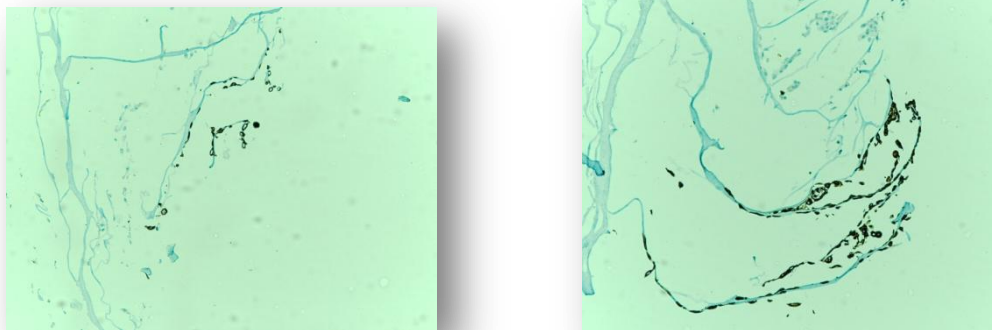


Figura 22. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7. Se observan las células positivas para expresión de Citoqueratina 7 como las de un citoplasma tono café muy oscuro.

Aumento 10x.

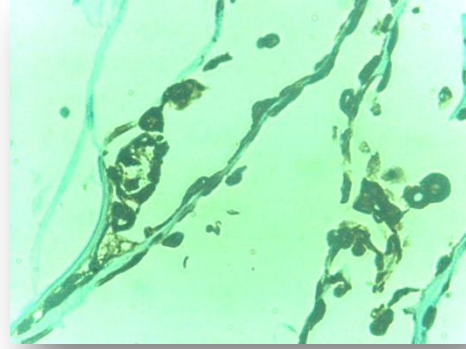
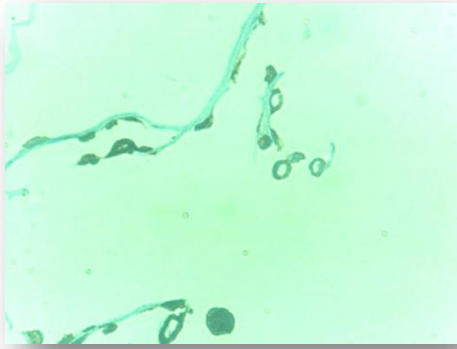


Figura 23. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7. A mayor aumento se observan las células positivas para expresión de Citoqueratina 7 como las de un citoplasma tono café muy oscuro. Aumento 40x.

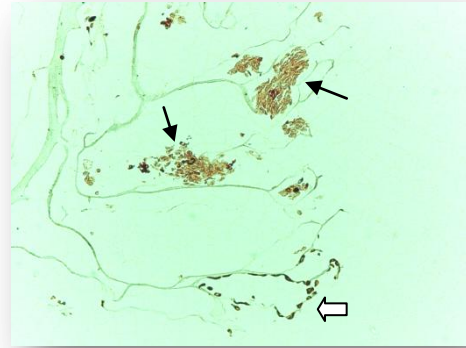
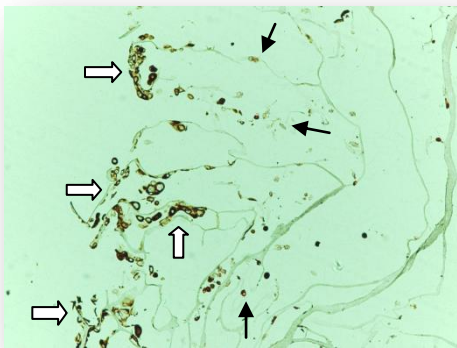


Figura 24. Co-cultivo en soportes de colágeno tipo I Tinción CK-7 + Vimentina. Se observan las células positivas para expresión de Citoqueratina 7 como las de un citoplasma tono café muy oscuro (flechas blancas) y las positivas para Vimentina en tono rojizo oscuro (flechas negras). Aumento 10x.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El presente trabajo es la continuidad del iniciado por Vásquez AC et al. (2009), en el que se buscaba la obtención de un co-cultivo de células caliciformes y fibroblastos en soportes de colágeno tipo I, pero que no se logró concluir. Es así como tomando como base los hallazgos y los experimentos ya realizados en el mismo laboratorio y con idénticos recursos se inició la fase final de obtener el co-cultivo.

Los primero co-cultivos analizados por histología mostraron una muy baja densidad celular por lo que se aumentaron progresivamente los tiempos en la incubadora con cada tipo celular hasta llegar a 20 días para cada tipo celular, en promedio; con este cambio se observó aumento en el número de células sin que se evidenciara claramente la presencia de células epiteliales. En un procedimiento extenso como el realizado con tantas posibles variaciones descritas por diferentes autores son muchos los factores que pueden llevar al resultado final obtenido.

Dado que una de las principales dificultades estuvo en lograr el adecuado crecimiento de queratinocitos con la menor contaminación por fibroblastos, se optó por usar un medio de cultivo específico para ese tipo celular: K-SFM con este medio se observó adecuado crecimiento de queratinocitos y disminuyó la contaminación por fibroblastos. Sin embargo, y a pesar del cambio de medio usado no fue posible en el desarrollo del presente trabajo suprimir por completo la contaminación por fibroblastos, contaminación que se hacía aún más frecuente al procurar aumentar la población de queratinocitos mediante pasajes, aparentemente debido a la mayor facilidad y rapidez de fijación de los fibroblastos en comparación a los queratinocitos; es pues imprescindible continuar trabajando en el aislamiento de células epiteliales libres de fibroblastos. También fue difícil alcanzar un número elevado de queratinocitos en monocapa por la característica de estas células que tienden a desprenderse del plato de cultivo una vez han

alcanzado cierto nivel de confluencia. Es posible que el uso de factores adicionales en el medio como el factor de crecimiento epidérmico, que no fue posible usar en esta etapa del trabajo; faciliten y mejoren el mantenimiento de una monocapa de queratinocitos y su ampliación mediante pasajes a otras cajas de cultivo. Estas dificultades limitaron las opciones de realizar el co-cultivo al ser realizadas con una densidad celular que no era la ideal para sembrar queratinocitos.

Los cultivos de fibroblastos obtenidos fueron adecuados tanto en aspecto al microscopio como en número y se pudieron realizar varios pasajes sin que perdieran sus características morfológicas distintivas ni su capacidad proliferativa; no obstante, los cortes realizados por el laboratorio de patología no demuestran un número de fibroblastos en los soportes que se correspondiera con la cantidad de células observadas como monocapa. La razón para dicho hallazgo puede estar por un lado en la proliferación de fibroblastos sobre la superficie de la caja de cultivo en mayor medida que sobre los soportes y por otro lado en que las células seguramente se fijaron en la periferia de los soportes al no tener la opción de crecer en las áreas internas, una opción sería la de obtener soportes de menos de la mitad de grosor de los actuales lo que podría facilitar la formación de matriz extracelular por los fibroblastos cultivados adherida a estos soportes más delgados. Esto a su vez contribuiría a la formación de una monocapa de células epiteliales sobre un soporte ya pletórico de fibroblastos y su matriz extracelular y no la adhesión de estos queratinocitos a los lechos de la superficie del soporte.

Como conclusión final, considero que el procesamiento de co-cultivos celulares a partir de la ingeniería de tejidos, que puedan ser útiles como substitutos de la conjuntiva es un procedimiento extenso y, al menos en este punto en nuestro laboratorio, dispendioso; con múltiples pasos críticos lo que lo hace susceptible a gran número de fallas que impidan el logro final. Se debe continuar trabajando en la optimización de los cultivos de queratinocitos tanto para evitar su contaminación como para garantizar una capacidad proliferativa óptima al momento de realizar el co-cultivo. Cabe también anotar que la membrana amniótica podría ser un soporte

ideal por sus múltiples propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y estimulantes del crecimiento de células sanas. Su uso en el desarrollo de co-cultivos quedará a cargo de futuros investigadores.

La ingeniería de tejidos es un campo que cada día toma más y más adeptos, gran número de científicos alrededor del mundo están hoy en día haciendo avances en este sentido aplicables a la medicina en todas sus áreas y la Universidad Nacional de Colombia debe ser abanderada de este campo a nivel nacional y ojala Latinoamericano; así pues, a pesar de las dificultades que se vislumbraron con la realización de este proyecto, es necesario continuar creando grupos de trabajo y fortaleciendo los grupos de trabajo como el de la Dra Marta Fontanilla, que ya están conscientes de esta necesidad, para que la Universidad llegué algún día al lugar que debería tener entre las Universidades del mundo.

9. BIBLIOGRAFIA

1. **Álvarez MI, Rivas L, Toledano A, Rodríguez JJ, Oroza MA, Murube J** (1996). Estudio ultraestructural de la conjuntiva en pacientes con queratoconjuntivitis seca. *Arch Soc Española Oftalmol* 70:431-436.
2. **Aragona P, Di Pietro R, Spinella R, Mobrisci M** (2006). Conjunctival epithelium improvement after systemic pilocarpine in patients with Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol*. 90(2):166-70.
3. **Arango ML, Chamorro CI, Restrepo LM, Correa LA y Henao J** (2009). Características histológicas de la piel cultivada in vitro. *Revista argentina de Dermatología*. 90(4):190-200.
4. **Argueso P, Gipson IK** (2001). Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res*. 73(3):281-9.
5. **Biber JM, Holland EJ, Neff KD**. (2010). Management of ocular stem cell disease. *Int Ophthalm Clin*. 48:298-304.
6. **Burkitt HG, Young B, Heath JW**. (1997) *Histología Funcional Wheater*. Ed: Churchill Livingstone. Capítulo 21 página 386.
7. **Butler C, Navarro FA, Park CS, Orgill DP**. (2002). Regeneration of neomucosa using cell-seeded Colagen-GAG matrices in athymic mice. *Ann Plast Surg*. 48:298-304.
8. **Chen H, Yamabayashi S, Tanaka Y, et al**. (1997) Structure and composition of rat precorneal tear film a study by an in vitro cryofixation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Vol 38; 381-387
9. **Collins CE y Koay P**. (2010) Xerophthalmia because of Dietary-Induced Vitamin A deficiency in a young Scottish man. *Cornea*; 29:828-829.
10. **Cordeiro MF, Occleston NL, Khaw PT**. (1997). New concepts: manipulation of the wound-healing response. *Dev Ophthalmol*. 28:242-60.
11. **Ehlers N, Kessing SV, Norn MS** (1972). Quantitative amounts of conjunctival mucus secretion and tears. *Acta Ophthalmologica* 50:210-214.
12. **Faraj HG, Hoang-Xuang T** (2001). Chronic cicatrizing conjunctivitis. *Current Opinion in Ophthalmology* 12:250-257.
13. **Farjo AA y Soong HK**. (2003). **Chap 56. Corneal Epithelium In: Yanoff M, Duker YS, Augsburger JJ, eds. Ophthalmology. 2nd edition: Mosby. 413-421.**
14. **Fry TL, Woods CI** (1987). Readily available full-thickness mucous membrane graft. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 113 (7):770-1.
15. **Geggel HS, J Friend and RA Thoft**. (1985). Collagen gel for ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol 26, 901-905.
16. **Gendler SJ, Spicer AP** (1995). Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol*.;57:607-634
17. **Gipson IK, Tsumotu Inatomi** (1996). Cellular Origin of mucins of the ocular surface. *Abstracts II Int'l Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndromes*. Bermuda.

18. **Gipson IK.** (2004). Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*; 78:379–388.
19. **Hollingsworth MA, Swanson BJ** (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*; 4:45– 60
20. **Hsu Wei-Cherng, Mark H. Spilker, Ioannis V. Yannas and Peter A. D. Rubin** (2000). Inhibition of Conjunctival Scarring and Contraction by a Porous Collagen-Glycosaminoglycan Implant. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 41: 2404-2411.
21. **Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S.** (2005). Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea*. 24 (8), (Suppl. 1):S32–S38).
22. **International Dry Eye Workshop (DEWS).** (2007). *The ocular surface*; 5: 65- 204.
23. **Johnson ME, Murphy PJ** (2004). **Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome.** *Prog Retin Eye Res*. 23(4):449-74
24. **Karesh JW, Putterman AM** (1988). Reconstruction of the partially contracted ocular socket or fornix. *Arch Ophthalmol*. 106 (4):552-6.
25. **Kenyon KR, Tseng SC.** Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709–722.
26. **Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C and Kinoshita S.** Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108:1569-74.
27. **Kunert KS, Keane-Myers AM, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK** (2001). Alteration in goblet cell numbers and mucin gene expression in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42 (11):2483-9.
28. **Lee SY, Oh JH, Kim JC, Kim YH, Kim SH, Choi JW.** (2003). In vivo conjunctival reconstruction using modified PLGA grafts for decreased scar formation and contraction. *Biomaterials*. 24 (27):5049-59.
29. **Lemp MA, Dohlman CH, Kuwabara T, Holly FJ, Carroll JM** (1971). Dry eye secondary to mucus deficiency. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 75 (6):1223-7.
30. **Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SCG** (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell research*. 17:26-36
31. **Lima, V. (2002)** Manejo inicial de las quemaduras químicas oculares. *Trauma*, Vol. 5, Núm. 1, pp. 20-23.
32. **McClellan KA.** (1997). Mucosal defense of the outer eye. *Surv Ophthalmol*; Vol 42, No 3, pp. 233-246.
33. **Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K.** (2003) P2Y₂ Receptor Elicits PAS-Positive Glycoprotein Secretion from Rabbit Conjunctival Goblet Cells In Vivo. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics*. August; 19(4):345-352
34. **Murube J.** (1997). Clasificación clínica del ojo seco. *Ojo Seco-Dry Eye*. Tecnimedia Editorial; 39-44.
35. **T Nakamura, T Inatomi, C Sotozono, T Amemiya, N Kanamura, S Kinoshita.** (2004). Transplantation of cultivated autologous oral mucosal

- epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*; **88**:1280-1284.
36. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** (2006). 59ª Asamblea Mundial De La Salud 24 de abril de 2006
http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59/A59_12-sp.pdf. Consultada el 16 de nov de 2010.
 37. **Panda, A** (2007). **Corneal Graft Rejection.** *Survey of ophthalmology* volume 52 No 4: 375–96.
 38. **Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M** (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 349:990-93.
 39. **Pérez S, Doncel A, Roa C.A, Fontanilla M.R.** (2001). Estandarización de un Método Para la Elaboración de un Análogo de Dermis Humana. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas.* 30 (1): 9-15.
 40. **Quintana, R.** (2004). Penfigoide ocular cicatricial. *Annals d'Oftalmologia;* 12(4):198-206.
 41. **Ralph RA** (1975). Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol.* 14(4):299-302.
 42. **Ralph RA** (1998). Chemical injuries of the eye. Tasman W, Jaeger EA, Ed: Duane's. Clinical Ophthalmology. 22nd ed. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins.
 43. **Sack RA, Bogart B, Sahe S, Beaton A, Lew G** (1996). Characterization and origin of major non-reducible high molecular weight sialoglycoproteins in tears. *Abstracts II Int'l Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndromes.* Bermuda, p 45.
 44. **Samuel C. Yiu, Padmaja B. Thomas and Pho Nguyen.** (2007). Ocular surface reconstruction: recent advances and future outlook. *Current Opinion in Ophthalmology,* 18:509–514.
 45. **Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, Tuft SJ, Daniels JT, and Geerling G** (2009). Tissue engineering for conjunctival reconstruction: established methods and future outlooks. *Curr Eye Res.* Nov;34(11): 913-24.
 46. **Shatos MA, Rios JD, Tepavcevic V, Kano H, Hodges R, Dartt DA** (2001). Isolation, characterization, and propagation of rat conjunctival goblet cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(7):1455-64.
 47. **Situ H, Wei G, Smith CJ, Mashhoon S, Bobek LA** (2003). Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. *Biochem J;* 375:175–182.
 48. **Triana C.** (2004). Estandarización de cultivos celulares tridimensionales para injertos lamelares corneales. Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Oftalmología. Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, *Universidad El Bosque,* Bogotá.
 49. **Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH** (1997). Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol.* 124(6):765-74.
 50. **Tseng SCG, Tsubota K.** (1997). Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol.* 124:825-835.

51. **Vásquez AC, Pardo JM, Fontanilla MR.** (2009). Desarrollo de un co-cultivo de células caliciformes y fibroblastos de conjuntiva de conejo. Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Oftalmología. Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá.
52. http://www.tearfilm.org/dewsreport_Spanish/ Consultada el 5 de diciembre de 2010.
53. <http://www.who.int/blindness/causes/en/index.html>. Consultada el 27 de diciembre de 2010.