



No. 2012 - 027

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL MILITAR CENTRAL

TRABAJO DE GRADO

OFTALMOLOGÍA

VIABILIDAD DEL LISADO DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO SUPLEMENTO PARA EL CULTIVO
DE CÉLULAS MADRE DE LIMBO CORNEOESCLERAL

AUTORES:

JOSE DAVID MIRANDA
LINA JEANETTE VALERO
FERNANDO YAACOV PEÑA
LUZ MABEL AVILA
YADIRA VASQUEZ
SEBASTIAN ROBLEDO
ANGELA RIVEROS AROCHA

ASESOR TEMATICO:
LINA JEANETTE VALERO

2013

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Identificación y formulación del problema	6
4. Justificación	23
5. Objetivos e Hipótesis	24
6. Metodología	25
7. Plan de análisis	37
8. Aspectos éticos	38
9. Cronograma	39
10. Presupuesto	40
11. Resultados	42
12. Discusión	45
13. Conclusiones	47
14. Recomendaciones	48
15. Referencias Bibliográficas	49

1. RESUMEN

TÍTULO:

VIABILIDAD DEL LISADO DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO SUPLEMENTO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE LIMBO CORNEOESCLERAL

AUTORES:

José David Miranda. E-mail: josedmiranda@yahoo.com

Lina Jeanette Valero. E-mail: livalero@hotmail.com

Fernando Yaacov Peña. E-mail: ojosalud@gmail.com

Luz Mabel Ávila. E-mail: mabelavila_us@yahoo.com

Sebastián Robledo. E-mail: sebasr14@hotmail.com

Ángela Riveros. E-mail: angirivers5@hotmail.com

Asesores temáticos:

Lina Jeanette Valero

Luz Mábel Avila

Programa:

Oftalmología

Objetivo. El objetivo de este estudio es conseguir el crecimiento de células madre de limbo corneo escleral que sean viables para el futuro trasplante en ojos con enfermedades de la superficie ocular, utilizando como suplemento el Lisado de Plasma Rico en Plaquetas o Suero Bovino Fetal.

Metodología:

Diseño. Estudio experimental, descriptivo, en laboratorio especializado para caracterizar

fenotípicamente el crecimiento de células de limbo corneoescleral, a través de la medición de las proteínas P-63 y Ki-67, obtenidas de especímenes de banco de ojos certificado, usando como suplementos el Lisado de Plasma Rico en Plaquetas o Suero Bovino Fetal.

Población. Anillos corneoesclerales provenientes de ojos de banco a los que se les extrajeron muestras de limbo para cultivarlos en medios suplementados.

Tamaño de la muestra. Se realizaron 20 cultivos para aplicar suplementos con el fin de observar y comparar el perfil de crecimiento de las células en los medios de cultivo.

Variables. p63, ki-67 y el número del tejido.

Resultados. De los ojos obtenidos para extracción de muestras de limbo corneoescleral, se logró llevar a término el cultivo de 5 de ellos, con recuento mayor de un millón de células para el procesamiento final y realización de inmunohistoquímica. En un caso no hubo expresión de marcadores en ninguno de los medios de cultivo.

En este estudio el LPRP demostró ser tan bueno como el SBF para el soporte y mantenimiento de células madre de limbo corneoescleral.

Conclusión: En nuestro estudio el LPRP soportó el crecimiento y mantenimiento de CM de limbo corneoescleral. Por lo tanto, a pesar de que el SFB continúa siendo el Gold Standard como suplemento en los cultivos de CM de limbo corneoescleral, recomendamos el uso de LPRP como suplemento alternativo y a un menor costo. Por otra parte se hace evidente la necesidad de ampliar esta investigación con un mayor número de muestras de tejido viable.

Palabras clave: Células madre, limbo corneoescleral, superficie ocular, cultivos celulares, suero bovino fetal, lisado de plasma rico en plaquetas, p-63, ki-67.

2. INTRODUCCION

La superficie ocular es una unidad funcional conformada por la conjuntiva (bulbar, tarsal y de los fónix), la cornea (epitelio y estroma subyacente), limbo esclerocorneal (zona anatómica de transición entre la cornea y la conjuntiva bulbar) y la película lagrimal con sus 3 capas (mucinoso, acuoso y lipídico). Las enfermedades de la superficie ocular como el Síndrome de Sjögren, Síndrome de Steven Johnson y las secuelas de trauma y quemaduras son entidades que suprimen la regeneración normal del epitelio corneal ocasionando una marcada disminución en la capacidad regenerativa del mismo y disfunción de las células limbares para restablecer la función y mantener la transparencia de la cornea. Por otra parte, cabe resaltar que la gran mayoría de pacientes afectados por este tipo de patologías, se encuentran en edad de productividad laboral, por lo tanto el impacto social y laboral que produce este tipo de enfermedades. Una de las terapias más innovadoras en la actualidad es el implante de células madre, que han crecido sobre membrana amniótica, con el fin de regenerar el tejido, recuperar la transparencia corneal y la función de la superficie ocular. La introducción de esta alternativa terapéutica busca mejorar las condiciones de vida de los pacientes con las afecciones descritas. Este tipo de terapia, sin embargo, no ha tenido el desarrollo científico suficiente en nuestro medio, por lo cual es importante incentivar la investigación y el liderazgo del Hospital Militar y la Universidad Militar Nueva Granada, siendo imperioso que el servicio de oftalmología se involucre en esta línea de investigación científica.

3. IDENTIFICACION Y FORMULACION DEL PROBLEMA

(MARCO TEÓRICO)

Los pacientes con alteraciones severas de la superficie ocular como es el caso de los pacientes que han tenido algún trauma de guerra que compromete la transparencia corneal y las células del limbo corneoescleral, podrían beneficiarse si se manejan con un injerto que incluya células madre. Por otra parte los pacientes del HMC con diagnóstico de Ojo Seco severo, Síndrome de Steven Johnson, Síndrome de Sjögren o quemaduras del segmento anterior representan un gran reto en oftalmología, dado que corresponden a entidades en las cuales los recursos médicos disponibles en la actualidad son insuficientes. Estas patologías cursan con grados variables de insuficiencia limbar, dependiendo de su extensión y severidad, y pueden llevar a pérdida permanente de la transparencia de la cornea o descompensación de la misma. Igualmente es bien reconocida la dificultad para el tratamiento efectivo de este tipo de patologías, y que el arsenal terapéutico se queda corto para lograr desenlaces favorables en este tipo de pacientes, como la recuperación de la función de la superficie ocular y de la transparencia corneal. Lo anterior sumado al gran impacto social y laboral que conlleva este tipo de patologías, ya que los pacientes afectados se encuentran casi siempre en edad de productividad laboral. De esta manera, emerge la terapia con Células Madre, como una alternativa terapéutica eficaz, dirigida a restablecer la función de la superficie ocular perdida por enfermedades, por lo general, devastadoras y con pobre pronóstico visual.

3.1. CELULAS MADRE (CM): Son células de larga vida en el cuerpo, que tienen la habilidad de diferenciarse en células especializadas para crear nuevos tejidos y son capaces de autorregenerarse. Existen células madre de diferentes tipos; algunas de ellas como las CM embrionarias tienen el

potencial de formar múltiples tejidos, mientras otras CM más especializadas pueden formar unas pocas o incluso un solo tipo de célula.

Se clasifican según su potencial o según su origen. Según su potencial las categorías son: Totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales o unipotenciales. Las CM Totipotenciales tienen la habilidad natural para formar cualquier célula en el cuerpo humano, incluso células extraembrionarias. Las CM Pluripotenciales son muy similares a las totipotenciales, sólo que no pueden desarrollar células extraembrionarias. Las CM Multipotenciales, son células que pueden producir un número limitado de células, por ejemplo CM neurales o CM hematopoyéticas. CM Unipotenciales son células similares a las células normales del cuerpo, pero a diferencia de ellas son consideradas CM por que pueden autorreplicarse, por ejemplo las células epiteliales.

La segunda forma de clasificar las CM es según el tipo de tejido del cual se aíslan y son de dos tipos: *Células madre Embrionarias* y *Células madre Adultas*. Las CM embrionarias son células no especializadas y tienen un gran potencial natural. Las CM adultas son células más especializadas y parcialmente diferenciadas. (10)

La superficie ocular está constituida por el epitelio corneal, limbar y conjuntival (caracterizados por ser tejidos estratificados, escamosos y no queratinizados, procedentes del ectodermo (4)(3). Se ha mostrado gran interés por el epitelio limbar y conjuntival debido a la presencia de células madre en estos tejidos para tratamientos médicos regenerativos. El epitelio conjuntival presenta sus células precursoras en el fórnix conjuntival, mientras que las células madre del epitelio corneal se encuentran en las capas basales de la cornea periférica en zona limbar dentro de elevaciones fibrovasculares radiadas llamadas Palizadas de Vogt (4) (fig.1), estas células juegan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular del epitelio corneal. A medida que estas

células migran hacia la superficie se van diferenciando, este proceso es definido como diferenciación centripeta, siendo este proceso característico de células madre del limbo corneal (2)

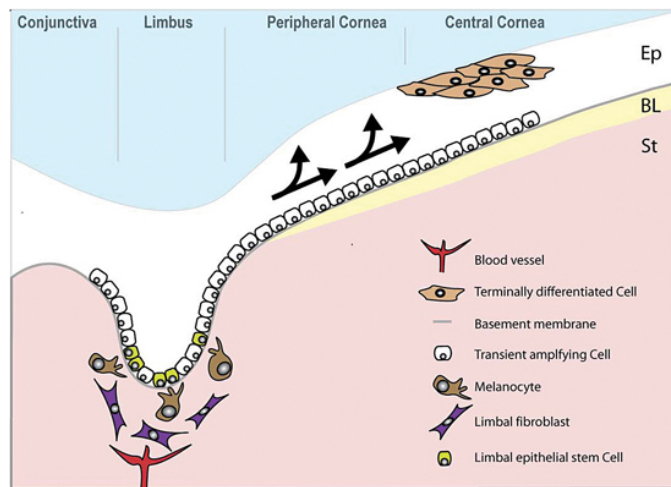


Figura 1.

El Limbo Corneoescleral. Las células madre del epitelio limbar yacen en la capa basal del epitelio (Ep). Las células hijas amplificadoras transitorias (TACs) se dividen y migran hacia la cornea central (flechas) para repoblar el epitelio que descansa sobre la Capa de Bowman (BL). El estroma (St) subyacente a los nidos de células madre del epitelio limbar está poblado por fibroblastos y melanocitos y cuenta a su vez con irrigación sanguínea. (Tomado de Limbal epithelial stem cells of the cornea. Genevieve A. Secker and Julie T. Daniels, Cells for Sight Transplantation and Research Programme, Department of Ocular Biology and Therapeutics, UCL Institute of Ophthalmology, London, UK).

Las células madre se caracterizan por encontrarse pobremente diferenciadas, presentan alta capacidad de auto renovación con ciclos celulares largos, además poseen capacidad de división simétrica y asimétrica en donde su proliferación se activa por cicatrización o puesta en cultivo. Estas células dan origen a células de amplificación transitorias (TACs) que darán origen a células adultas diferenciadas de los diferentes tejidos (fig.2). Estas células diferenciadas presentan ciclos de vida cortos y son regeneradas por proliferación celular (2)

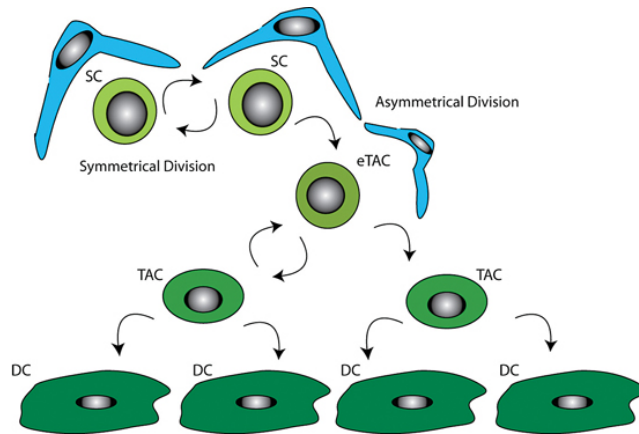


Figura 2.

Ilustración del control de las Células Madre en los nidos. Se piensa que las CM del limbo CE sufren divisiones celulares asimétricas produciendo una CM, que permanece en los nichos de CM para repoblar el "pool" de CM, y una célula hija amplificadora transitoria temprana (eTAC). Esta célula más diferenciada eTAC es removida del nicho y es capaz de dividirse produciendo Células amplificadoras transitorias (TAC), eventualmente dando origen a células diferenciadas terminales (DC). Las dobles flechas representan la capacidad de autorrenovación de las CM. Las células de soporte de los nichos (azules) rodean las CM (verde claro). (Tomado de de Limbal epithelial stem cells of the cornea. Genevieve A. Secker and Julie T. Daniels, Cells for Sight Transplantation and Research Programme, Department of Ocular Biology and Therapeutics, UCL Institute of Ophthalmology, London, UK).

Se ha demostrado diferentes marcadores negativos para células madre de limbo corneal como conexina - 43, citoqueratinas 3 y 12. También se han identificado marcadores positivos, como p63, integrina 9 y ABCG2 (5)(6)(2)(7)(8). El p63 es miembro de la familia p53 localizado en el cromosoma 3q27. Es un factor de transcripción que tiene un papel único en la morfogénesis y se ha mostrado que se expresa en el núcleo de los queratinocitos con potencial proliferativo. Pellegrini y cols identificaron el p63 como un marcador de CM de queratinocitos del epitelio corneal (21). Es un buen marcador para detectar las células madres del epitelio corneal. La p63 podría utilizarse en práctica clínica para determinar la actividad de las células madres del epitelio corneal. Se usa como marcador de células madre epiteliales. Algunos trabajos demuestran que la p63 identifica las células basales epiteliales (incluyendo células madre) en la próstata, mama, bronquios, epidermis y limbo corneal. Igualmente la proteína p63 es altamente expresada en las células basales de muchas células epiteliales humanas, especialmente en poblaciones progenitoras o células madres de tejidos

epiteliales. En este trabajo utilizamos la inmunohistoquímica para evaluar las localizaciones del p63 en la superficie ocular humana. Adicionalmente se sabe que el glicocalix es negativo en limbo pero en conjuntiva es positivo (9). Es de gran importancia poder localizar y caracterizar estas células madre para poder realizar adecuadamente cultivos celulares de éstas para implementación médica. Ha requerido un gran trabajo lograr encontrar marcadores para este tipo de células madre y actualmente se siguen llevando a cabo estudios para mejorar este proceso de caracterización.

La expresión del Ki-67 está estrictamente asociada con *proliferación celular*, es un antígeno nuclear. Las CM tienen ciclos celulares largos y se dividen infrecuentemente (21). Durante la interfase el antígeno puede ser exclusivamente detectado dentro del núcleo, mientras que en mitosis la mayoría de la proteína se reubica en la superficie de los cromosomas. El hecho de que la proteína Ki-67 esté presente durante todas las fases del ciclo celular G(1), S, G(2) y mitosis, pero ausente en la fase G(0), la hace un excelente marcador para determinar la llamada "*fracción de crecimiento*" de una población celular dada.

No sólo ha sido complicado caracterizar estas células, sino también encontrar medios adecuados para realizar los cultivos de éstas. Actualmente se usan diferentes medios como colágeno o gel de fibrina, aunque la membrana amniótica es el más usado debido a que ayuda a preservar las tasas de replicación, mantiene las características físicas de las células madre del limbo esclerocorneal, además favorece a las cinéticas de ciclo celular (2). Es importante estandarizar correctamente esta técnica de cultivo de células madre para su posterior implementación y tratamientos médicos regenerativos.

3.2. LA CORNEA: Porción de la superficie ocular transparente, con función refractiva. Posee gran resistencia mecánica y propiedad de barrera impermeable entre el ojo y el ambiente externo. Es

estructural y funcionalmente especializada para brindar las propiedades ópticas requeridas. Es avascular, absorbe oxígeno del ambiente en su superficie anterior y obtiene la mayoría de nutrientes adicionales a partir del humor acuoso en su superficie posterior. Algunas de las funciones protectoras y ópticas de la cornea dependen de los tejidos adyacentes como la conjuntiva y las glándulas lagrimales (principal y accesorias). La película lagrimal que estas producen se extiende sobre la cornea gracias al parpadeo, resultando en una superficie corneal anterior lisa. La resistencia mecánica de la cornea está dada por su matriz de colágeno presente en el estroma, y depende de mecanismos que regulan la hidratación y el metabolismo para mantener la transparencia. Su función de protección está dada por la innervación sensitiva extraordinaria, cuenta con terminaciones nerviosas libres para no comprometer la transparencia. (11) (fig.3)

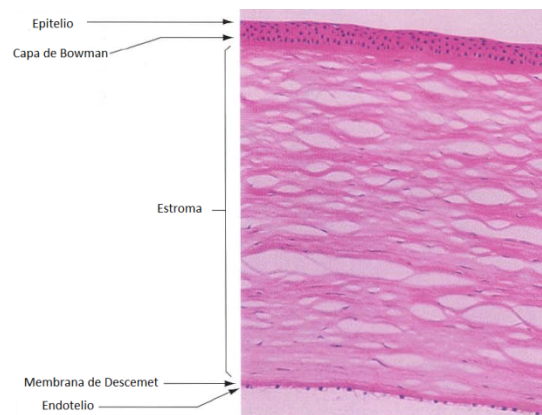


Figura 3.

Cornea normal. Tinción con Hematoxilina-eosina de una sección transversal de las capas de la cornea.

Tomado de BCSC Basic and Clinical Science Course. AAO. Section 8. Cap. 1. Estructura y función normal de la superficie ocular y la cornea.

3.3. PELICULA LAGRIMAL: De su estabilidad depende tener una buena visión y una superficie ocular sana. Tiene funciones estructurales para proporcionar una superficie corneal refractiva lisa y uniforme. Funciones de lubricación para facilitar un movimiento confortable de los párpados,

minimizando el trauma mecánico del parpadeo. Posee igualmente propiedades antimicrobianas y múltiples factores biológicos como electrolitos, glucosa, inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, albúmina y oxígeno. Contiene también sustancias biológicamente activas como histamina, prostaglandinas, factores de crecimiento e interleuquinas. Por lo tanto, además de su función de lubricación, es fuente de factores que regulan el mantenimiento y la reparación del epitelio corneal. (11). Conformada por 3 capas: Mucinoso, compuesta de mucopolisacáridos, producidos por las células caliciformes, se adhiere fuertemente al epitelio a través de las microvellosidades y proporciona propiedades de fluidificación evitando el microtrauma del parpadeo. Capa acuosa: capa más gruesa, producida principalmente por la glándula lagrimal y las glándulas de Krause, Wolfring; se une a las porciones hidrofílicas de los mucopolisacáridos de la capa mucosa. Capa lipídica: capa más externa, producida por las glándulas de Zeiss y de Meibomio, proporciona estabilidad y duración a la película lagrimal, evitando su evaporación.

La película lagrimal tiene un grosor de 0.7 mm, y su volumen es de 6.5 +/- 0.3 uL.

3.4. EL LIMBO CORNEOESCLERAL: Es la transición anatómica entre esclera-conjuntiva y cornea. En las capas basales de su epitelio es donde se encuentran las Células Madre (Stem Cells) del epitelio corneal. Es aquí donde el epitelio cilíndrico estratificado de la conjuntiva se continua con el epitelio escamoso estratificado de la cornea, y la sustancia propia vascular del epitelio conjuntival finaliza en el plexo vascular límbico, que aporta nutrientes y oxígeno a las células germinales, las cuales poseen una importante actividad mitótica. (fig.4). Está demostrado que un daño de todo el limbo o de una porción de éste produce un crecimiento de la conjuntiva sobre la cornea, dando lugar a un epitelio más pálido e irregular, a neovascularización y a erosiones recidivantes o defectos epiteliales persistentes. (12)

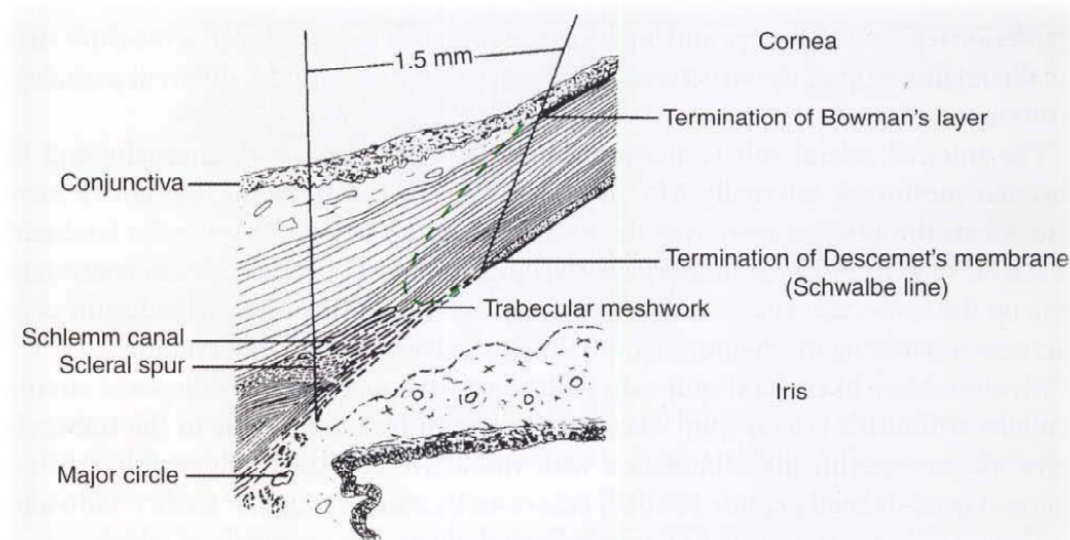


Figura 4.

Limbo Corneoescleral. Tomado de BCSC Basic and Clinical Science Course. AAO. Section 2. Cap. 2. The eye.

3.5. PATOLOGIAS ASOCIADAS A DISFUNCION DE LA PELICULA LAGRIMAL Y CÉLULAS MADRE:

3.5.1. Ojo seco: Según la última definición del DEWS (Dry Eye WorkShop de 2007) se considera al ojo seco como una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que resulta en síntomas de discomfort, alteraciones visuales e inestabilidad de la película lagrimal con potencial daño de la superficie ocular. Acompañado de incremento en la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. (13)

3.5.2. Síndrome de Sjögren: Exocrinopatía en la cual las glándulas lagrimal y salivares son el blanco de un proceso autoinmune, en el cual son infiltradas por células T activadas, causando muerte de células acinares y ducutulares e hiposecreción de lágrimas o saliva. La activación dentro de las glándulas lleva a la expresión de autoantígenos en la superficie de las células epiteliales (fodrin, Ro y La), y la retención de células T CD-4 y CD-8 específicas. La

hiposecreción se amplifica por un bloqueo neurosecretor potencialmente reversible, debido a efectos locales de citoquinas inflamatorias o a la presencia de anticuerpos circulantes (Anticuerpos anti-M3), dirigidos contra receptores muscarínicos dentro de las glándulas. Existen dos formas de Síndrome de Sjögren, el primario y secundario (cuando acompaña a otras enfermedades del tejido conectivo). (13)

3.5.3. Síndrome de Steven Johnson (SSJ): y su variante más severa, la Necrolisis epidérmica tóxica (NET), son desórdenes inflamatorios agudos que afectan la piel y las membranas mucosas. Aunque su incidencia es muy baja, cerca de 0.4 – 1 caso por 1 millón de personas para el SSJ y de 1-6 casos por 1 millón de personas para la NET, ambas pueden afectar a cualquier persona, a cualquier edad, usualmente como consecuencia de reacciones adversas a medicamentos. Una gran variedad de drogas incluyendo antibióticos, Antiinflamatorios no esteroideos, anticonvulsivantes, y múltiples otros tipos de medicamentos se han reportado como causantes de reacciones a drogas severas y como inductores de SSJ o NET. Las tasas de mortalidad para SSJ y NET son altas: 1-5% y 25-35%, respectivamente. Las complicaciones oculares ocurren en más del 50% de los pacientes; la inflamación de la superficie ocular se desarrolla rápidamente en la etapa aguda. Esta inflamación extensa de la superficie ocular, a menudo se acompaña de formaciones pseudomembranosas y defectos epiteliales corneales, conjuntivales o ambos. La vía común luego de los estadios agudos, incluye defectos epiteliales persistentes, ulceración y perforación, finalmente desarrollo de cambios cicatriciales como neovascularización, opacificación, queratinización y simbléfaron. Incluso luego de que los daños de la fase aguda hayan disminuido, pueden quedar secuelas permanentes como daño visual o ceguera e inflamación conjuntival crónica prolongada, requiriendo manejo de por vida para el discomfort ocular, convirtiéndose así, tanto el SSJ como la NET, en las

enfermedades más devastadoras de la superficie ocular, siendo igualmente difíciles de tratar. La pérdida de las Células Madre del epitelio corneal ubicadas en el limbo, evidenciada por la pérdida de las palisadas de Vogt, es la característica ocular más común del SSJ, resultando en conjuntivalización de la cornea y cambios cicatriciales de la superficie ocular. La Queratoplastia penetrante en estos casos estaría contraindicada, ya que la insuficiencia limbar no va dar soporte al trasplante. (16)

3.5.4. Quemaduras de la superficie ocular: Pueden ser químicas por ácidos o por álcalis (fig.5), o térmicas. Su espectro es muy amplio y va desde un daño leve, unilateral del epitelio hasta quemaduras bilaterales que amenazan la visión, con destrucción de la superficie ocular y daño de estructuras intraoculares. El daño de las Células Madre del limbo y el ojo seco asociado, los defectos epiteliales persistentes, las queratitis infecciosas, lisis estromal y perforación a menudo complican quemaduras severas. Las quemaduras por álcalis, a menudo tienen pobre pronóstico, ya que la saponificación de las membranas celulares llevan a rápida penetración del álcali a través de la cornea y la esclera. (14) La gran mayoría de las víctimas son pacientes jóvenes y casi siempre ocurren en accidentes industriales, en casa y asociados a asaltos criminales. (15)

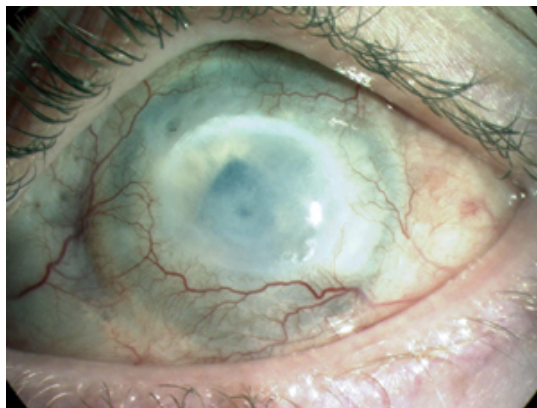


Figura 5.

Quemadura por álcali con neovascularización corneal y disfunción limbar (tomado de Limbal epithelial stem cells of the cornea. Genevieve A. Secker and Julie T. Daniels, Cells for Sight Transplantation and Research Programme, Department of Ocular Biology and Therapeutics, UCL Institute of Ophthalmology, London, UK).

3.6. SUPLEMENTOS PARA CULTIVO DE CELULAS MADRE

3.6.1. Suero Bovino Fetal (SBF): ventajas y desventajas

El uso común de SBF en cultivos de Células Madre (CM) como fuente de factores de crecimiento conlleva el riesgo de transmisión de patógenos conocidos y desconocidos, así como xeno-inmunización contra antígenos bovinos. La situación ideal sería evitar la utilización de SBF durante la manipulación de células madre humanas. Hasta el momento la propagación óptima de CM cultivadas (CMC) ha sido estrictamente dependiente del uso en cultivo de SFB como suplemento. Se ha propuesto como alternativa el uso de suero humano del grupo AB al 20% como suplemento, con el fin de reducir el número de antígenos bovinos encontrados en cultivo y así mejorar la terapia con este tipo de células.

Aunque las CMC propias no son altamente inmunogénicas; cuando son expandidas en SBF, probablemente van a generar respuestas inmunes en algunos pacientes en la primera administración, además la mayoría de los pacientes responden negativamente si se repite la administración de células y pueden presentar reacciones anafilácticas; lo anterior se ha observado en varios pacientes que recibieron repetidas administraciones de linfocitos o células dendríticas cultivadas en SBF.

En un ensayo clínico para el tratamiento de osteogénesis imperfecta, se identificó un paciente que desarrolló anticuerpos contra las proteínas de SBF después del tratamiento con CMC; este paciente no presentó éxito ante el injerto ni crecimiento celular.

Varios análisis han revelado que una inyección única de 100 millones CMC que crecen en condiciones normales (SBF al 20%) llevaría con ella de 7 - 30 mg de proteínas séricas de bovino. La administración repetida de CMC contaminadas con proteínas de SFB tiene una alta probabilidad de causar rechazo inmunológico de las células inyectadas y también puede conducir a complicaciones graves, como reacciones autoinmunes contra sus propias células Stem.

Durante las últimas décadas, los múltiples efectos inmunomoduladores del SBF han sido demostrados, incluyendo la activación de células NK, inducción del complejo mayor de histocompatibilidad sin restricción, citotoxicidad mediada por células, inducción de la secreción de linfoquinas, y activación policlonal de células B. Es probable que muchos, si no todos, estos efectos pueden haber desempeñado un papel en la generación de respuestas en estos pacientes.

En 1991, Reisser, Michell y cols, describen la adsorción de los componentes de suero fetal bovino en células cancerígenas de colon de ratas que modificaron la respuesta inmune de esas células cuando se inyecta en ratones sinérgicos. Del mismo modo, la detección de anticuerpos de SBF por inmunodifusión en pacientes después de infusiones con cultivos de linfocitos sugiere que los procedimientos de lavado antes de la infusión son insuficientes para eliminar las proteínas extrañas de SBF en los linfocitos. También existe la posibilidad de la sensibilización de los pacientes con SBF en vez de limitarse a una actividad pasiva actúa como vehículo para el ingreso de antígenos extraños.

Anticuerpos y neo-antígenos son expresados en las líneas celulares humanas cultivadas con SBF, esto se ha demostrado en el suero de aproximadamente 50% de individuos normales. Si estos anticuerpos de SBF se encuentran en los pacientes, el título es demasiado bajo para la detección por inmunodifusión luego de las infusiones. La presencia de los síntomas clínicos empeora la reacción con la administración reiterada de las células lo que sugiere un efecto de uno o más componentes del SBF con la repetición de la exposición. Sin embargo, no se puede descartar el título de anticuerpos en una anamnesis de modo natural, y los niveles de sensibilización con la ingesta de productos bovinos.

Aunque la calidad del SBF ha influido en la producción a gran escala de las CMC al tiempo que mantiene su linaje y capacidad de diferenciación, otros parámetros y condiciones de cultivo como la concentración de glucosa, la densidad celular de siembra entre otras características afectan el

resultado final.

Debido a los problemas que representa el uso de SBF como sustrato en medio de cultivo los investigadores han tratado de encontrar herramientas para el control de la calidad SBF aunque hasta el momento son relativamente primitivas y costosas dada la complejidad de la muestra y la gran cantidad de SBF utilizado por cultivo. Desde 1975, se ha demostrado un alto grado de variabilidad del suero entre los proveedores de las casas comerciales que producen el suero. Además, un reciente estudio de la evolución en el tiempo de los componentes del SBF, reveló que la cantidad de las proteínas estructurales de la matriz extracelular (que son las indicadoras del crecimiento celular) aumentó con el tiempo, y los componentes suministrados por el SBF (como los relacionados con la nutrición y propagación de las células relacionadas con las proteínas) disminuyó en el tiempo. Esa variabilidad no sólo obliga a la mayoría de los laboratorios a producir su propio SBF de uso continuo y a utilizar lotes preseleccionados, sino que además se hace difícil comparar los datos recibidos por los diferentes investigadores ya que todos elaboran sus productos en condiciones diferentes.

Finalmente, el SBF contiene altas concentraciones de fetuina-A, una glucoproteína con un amplio espectro biológico que influye sobre el crecimiento celular y la diferenciación, afectando proteinasas claves que participan en la regulación del proceso de diferenciación en las CMC.

3.6.2. Suplementos Libres de Proteína Animal

En teoría, el uso de los derivados de la sangre humana puede eliminar o reducir el riesgo de efectos secundarios de los productos de origen animal. Diferentes consideraciones indican que no debemos excluir la posibilidad de utilizar igualmente suero humano o plasma debido a la evidente participación de la coagulación y vías fibrinolíticas. De hecho, la necesidad de usar MSC como fuente de los tejidos para terapia celular en medicina regenerativa conlleva a su creación y propagación,

según los requisitos de calidad expuestos por las GPM (Good Manufacturing Practice), evitando los cultivos con sustancias animales con el fin de excluir el riesgo de infecciones e inmunogenicidad (Bull World Health Organ, 1997), y, por último, la obtención de células y tejidos que son genéticamente y epigenéticamente normales.

En particular, se ha demostrado que las MSC que crecen con derivados de suero humano mantienen todas las características de las células Stem sin alterarlas en cultivos prolongados, manteniéndolas en números ilimitados e indiferenciados con capacidad proliferativa y mantenimiento del cariotipo normal.

Por lo que se refiere a MSC, ha habido mucha controversia sobre lo que constituye un suplemento adecuado. Además del plasma humano, en el que se han identificado los varios factores que pueden ser importantes para la diferenciación de células Stem (por ejemplo, hormona de crecimiento y la insulina), varios estudios han centrado la atención en el uso de suero autólogo. Al respecto, varios documentos demuestran que el suero o plasma autólogo preserva la capacidad de diferenciación, e induce la proliferación de MSCS derivadas de médula ósea, lo que podría mejorar la terapias genéticas.

Varios estudios demuestran que las MSC cultivadas en los medios de suplementado con lisado de plasma rico en plaquetas (LPRP) muestran una vigorosa capacidad de proliferación, eficiencia clonogénica, actividad inmunosupresora, y capacidad de diferenciarse hacia osteocitos, condrocitos, y adipocitos. De particular interés es la reciente evidencia que el suero heterólogo AB de humanos, proporciona significativamente mayores efectos proliferativos sobre el tejido adiposo, mantiene la diferenciación y la capacidad de expresión de marcadores en toda el cultivo a largo plazo.

3.6.3. Componentes de Lisado de plasma rico en plaquetas LPRP

3.6.3.1. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

PDGF es una familia de factores de crecimiento compuesta, de dos cadenas de polipéptidos unidos por puentes disulfuro con un peso molecular que van de 27000 a 30 000 daltons. La exposición a PDGF estimula la síntesis de DNA y de proteínas en el hueso, así como la resorción ósea. PDGF se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas y es secretado durante la activación de la cascada de la coagulación, también se encuentra en monocitos, macrófagos, células del músculo liso, y células endoteliales. PDGF actúa como un potente mitógeno en células mesenquimales, entre las cuales se encuentran los fibroblastos, y las células musculares entre otras. El efecto de PDGF depende de la presencia de otros factores de crecimiento que permiten generar funciones quimioatrayentes para las células musculares, fibroblastos, macrófagos y leucocitos; y angiogénicas que estimulan la formación de colágeno y matriz in vivo.

3.6.3.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

TGF- β es una molécula de doble cadena del polipéptidos que se encuentra unida por enlaces disulfuro con un peso molecular de 25 000 daltons. Existe en tres diferentes productos genéticos: TGF- β 1, TGF- β 2, y TGF- β 3.

TGF- β 1 es la molécula más expresada, se encuentra en altas concentraciones en el hueso y las plaquetas, TGF- β es una molécula fundamental en la regulación que actúa por ambos mecanismos autocrino y paracrino, TGF- β 2 inhibe la acción de los linfocitos T citotóxicos (LTc) (62), y TGF- β 3 regula la interacción entre el mesénquima y el epitelio durante el desarrollo embrionario.

Cuando TGF- β es liberado por las plaquetas o secretada por macrófagos, ejerce sus efectos sobre células adyacentes, incluyendo fibroblastos, células stem de médula, células endoteliales, y

preosteoblastos. TGF- β estimula la angiogénesis y la producción de fibronectina, glicosaminoglicanos, y colágeno en el tejido conectivo. Una de las funciones más importantes de TGF- β parece ser la quimiotaxis y mitogénesis de los precursores de osteoblastos entre otros.

Otras funciones fundamentales de TGF- β es la acción anti-proliferativa y su capacidad de antagonizar los efectos mitógenos de otros péptidos, factores de crecimiento como PDEGF y PDGF.

El carácter de la actividad del factor de crecimiento, puede depender del contexto establecido por otras sustancias presentes, por ejemplo, el TGF- β estimula el crecimiento de los fibroblastos in vitro en presencia de PDGF pero se inhibe su crecimiento si está presente el factor de crecimiento epidérmico. in vivo, el TGF- β realza la proliferación y la migración de macrófagos, fibroblastos, y células endoteliales, mientras inhibe la proliferación de las células endoteliales vasculares in vitro.

3.6.3.3. Factor de Crecimiento Epidérmico Derivado de Plaquetas (PDEGF)

PDEGF fue descubierto por Cohen en 1962 y fue el primer factor de crecimiento descrito. Estimula la regeneración epidérmica, promueve la cicatrización de las heridas estimulando la proliferación de queratinocitos y fibroblastos dérmicos, y aumenta los efectos y producción de otros factores de crecimiento.

3.6.3.4. Factor de Angiogénesis Derivado de Plaquetas (PDAF)

PDAF tiene la capacidad de inducir la vascularización in vivo. Estimula las células del endotelio vascular por acciones directas o indirectas, y participa en el proceso por el cual los nuevos vasos sanguíneos invaden los tejidos devascularizados. Varias citoquinas y factores de crecimiento regulan PDAF, incluyendo IGF - 1, TGF- β y α , PDGF, el factor de crecimiento básico de fibroblastos beta (bFGF) y la interleuquina 1 β (IL-1 β). Este factor es altamente expresado por la inducción de hipoxia.

3.6.3.5. Factor-1 de Crecimiento Tipo Insulina (IGF – 1)

IGF - 1 es un polipéptido de cadena única hormona, que pesa 7500 daltons. IGF - 1 tiene 47% de homología con la insulina y estimula el crecimiento del cartílago, formación de la matriz del hueso, y la repetición de pre-osteoblastos y osteoblastos. IGF -1 puede estimular directamente las células que se activan (factor autocrino) y aumentar la actividad de fosfatasa alcalina en las células osteoblásticas, y participa en la autorenovación de células Stem. Transcritos de IGF - 1 han sido aislados de macrófagos en heridas, lo que sugiere que este factor de crecimiento también puede actuar como un mensajero local (Factor paracrino). IGF - 1 en combinación con PDGF puede aumentar la tasa y la calidad de la cicatrización de las heridas.

3.6.3.6. Factor 4 de Plaquetas (PF - 4)

PF - 4 es un quimioattractante de neutrófilos también liberado de los gránulos alfa, que puede ser parcialmente responsable de la afluencia inicial de neutrófilos en las heridas. También actúa como un quimio-attractante para fibroblastos y células Stem progenitoras, aumenta la adhesión de estas células al estroma y es un potente agente anti-heparínico.

Los efectos regenerativos observados con el uso del LPRP en estudios in vitro han indicado que el contenido de factores de crecimiento varía en función de la concentración de LPRP, modo de preparación, recuento de leucocitos, y el mecanismo por el que actúa el factor de crecimiento. La duración de la exposición y la concentración local de LPRP también puede influir en células endoteliales, fibroblastos, y la función de los osteoblastos in vitro.

4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de la superficie ocular como el Síndrome de Sjögren, Síndrome de Steven Johnson y defectos ocasionados por trauma de guerra o quemaduras, tienen un efecto importante sobre la función visual y la calidad de vida de los pacientes con estas afecciones.

Se ha visto que un trasplante de células madre de limbo corneo escleral puede restablecer de manera importante la función de la cornea y de la película lagrimal. Este procedimiento aún no se realiza en Colombia y se hace necesario comenzar por definir un cultivo de células madre viables para futuros trasplantes.

Hay un laboratorio con la experiencia suficiente en cultivo de células madre y un grupo de investigación de la Universidad Militar Nueva Granada y el Hospital Militar Central, dispuesto a trabajar en esta línea de investigación.

5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

a. Objetivo General:

Determinar la viabilidad del lisado de plasma rico en plaquetas como suplemento innovador para el cultivo de células madre obtenidas de limbo corneoescleral y compararlo con el suero bovino fetal.

b. Objetivos Específicos:

1. Lograr estandarizar una técnica adecuada de obtención de células madre de limbo corneoescleral en ojos de banco.
2. Conseguir una siembra apropiada de células madre de limbo corneoescleral.
3. Conseguir un cultivo y crecimiento apropiado de células de limbo corneoescleral, utilizando como suplementos el Lisado de Plasma Rico en Plaquetas o el Suero Bovino Fetal.
4. Tipificar fenotípicamente las células de limbo que crecen en los cultivos, realizando pruebas de inmunohistoquímica para la detección de p63 y Ki-67
5. Conseguir células madre de limbo corneoescleral viables.

c. HIPÓTESIS:

Es el suplemento de lisado de plasma rico en plaquetas igual o más favorable que el suero bovino fetal para la expansión y mantenimiento del cultivo de células madre de limbo corneoescleral?

6. METODOLOGÍA

a. Diseño del estudio

Es un estudio experimental, descriptivo, en laboratorio especializado para caracterizar fenotípicamente el crecimiento de células de limbo corneo escleral, a través de la medición de las proteínas P-63 y Ki-67, obtenidas de especímenes de banco de ojos certificado, usando como suplementos el Lisado de Plasma Rico en Plaquetas o Suero Bovino Fetal.

b. Lugar donde se realiza el estudio

Hospital Militar Central y Stem – Medicina Regenerativa en la ciudad de Bogotá (Colombia)

c. Población blanco

Anillos corneoesclerales provenientes de ojos de banco a los que se les extraerá una muestra de limbo para sembrarlo en medios suplementados.

d. Selección y tamaño de muestra

20 cultivos de explantes obtenidos de anillos corneoesclerales viables de banco de ojos con limbo preservado, los cuales se suplementaron con LPRP o SBF.

e. Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: Anillos corneoesclerales con limbo corneo escleral sano, muestra de limbo corneo escleral suficiente.

Exclusión: Ojos no aptos, muestras insuficientes de limbo.

f. Definición de las variables

Anillo corneoescleral de banco Cuantitativa Número de seguimiento

Muestra de limbo Cuantitativa Número de seguimiento

Expresión de proteína P-63 Cuantitativa Porcentaje de células

Expresión de proteína KI-67 Cuantitativa Porcentaje de células

g. Medición. Perfil de crecimiento e inmunotipificación de Células Madre de limbo corneoescleral en medios de cultivo suplementados con Suero Bovino Fetal o Lisado de Plasma Rico en Plaquetas con con microscopio de contraste de fase y con marcadores de inmunohistoquímica.

h. Intervención propuesta

No aplica

i. Procedimientos para la recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos para el control de calidad de los datos

Se llevará un registro en un formulario con los datos del ojo donado, la muestra de limbo y cada uno de los pasos del cultivo en el laboratorio. Se llevó a cabo un registro cada 2-3 días del crecimiento y evolución del cultivo en el laboratorio. Cada uno de los procedimientos fue realizado bajo la supervisión de personal experto en cada campo, garantizando así la mayor calidad en cada fase del trabajo de la siguiente manera:

El estudio se realizó en 4 fases:

Fase 1. Estandarización de la obtención del tejido límbico.

Se obtuvieron biopsias en 360° del limbo de anillos corneoesclerales de ojos viables de Banco de

Ojos y se realizó de forma simultánea estandarización de la inmunotipificación y de la zona de mayor concentración de células madre de limbo corneoescleral. El tejido humano fue manejado de acuerdo a la Comisión Directiva Europea 2003/63/EC.

Los recipientes que contienen los anillos corneoesclerales se mantuvieron en un refrigerador a una temperatura aproximada de 4° C, a fin de minimizar la posibilidad de crecimiento bacteriano y los procesos de autólisis. Con este método, el tejido ocular se mantiene más tiempo en estado óptimo después de la extracción del botón corneal.

Se colocó el anillo corneoescleral en la mesa de disección bajo microscopio quirúrgico sobre campos estériles. Con una tijera de Wescott y una pinza 0.5 de Bishop sin garra, se obtuvieron segmentos arciforme que incluyeron parénquima corneal superficial periférico, capas superficiales de la esclera perilímbica y conjuntiva limbar donante. Se obtuvieron por lo menos 5 muestras de buena calidad de cada anillo corneoescleral. El resto del material se manejó como desecho biológico siguiendo los protocolos de la institución.

Fase 2. Estandarización y validación del cultivo de células de limbo corneal.

Se realizó disociación enzimática y mecánica del tejido limbar. El cual fue cultivado para su expansión en los suplementos a comparar (Lisado de Plasma Rico en Plaquetas y Suero Bovino fetal). El explante de las células del limbo, se implantó en los platos de cultivo. El tejido límbico de 1x2 mm conteniendo células epiteliales y parte de estroma corneal es la fuente de células a implantar. El tejido obtenido se coloca en medio Ham F12 conteniendo 50mg/ml de gentamicina y 1.25 mg/ml de anfotericina B hasta que es procesado. El tejido limbar se expone a Dispasa II (1.2 U/ml en solución balanceada de Hank libre de Mg²⁺ y Ca²⁺ - HBSS) durante 5 min a 37°C bajo CO₂ 5% húmedo. El explante es luego cultivado en medio de DMEM, el cual es una mezcla 1:1 DMEM y Hams F12 conteniendo 5ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 5mg/ml de insulina,

5mg/ml de transferrina, 5ng/ml de selenito de sodio, mg/ml de hidrocortisona, 30ng/ml de toxina cólera A, 0.5% de dimetilsulfoxido (DMSO), 50mg/ml de gentamicina , 1.25 mg/ml de anfotericina B y 5% de suero autólogo, a 37°C bajo CO2 al 5% y humedad del 95%. El medio se renueva cada 2-3 días. Para el trasplante alogénico se utiliza el suero del donante y para trasplante no alogénico se usa suero de banco de sangre.

La extensión del crecimiento se monitorizó con un microscopio de contraste de fase. Durante la fase de expansión el crecimiento del epitelio limbar exhibe una capa celular compacta y uniforme. Los cultivos se mantuvieron por 3-4 semanas, tiempo durante el cual las células de limbo corneal crecieron y se dispersaron hasta formar una capa celular que cubría un área de 2-3 cm de diámetro y hasta alcanzar conteos celulares mayores de 1´000.000 de células (Cámara de Neubauer). Cada semana se realizaron test bacteriológicos para evaluar la posible contaminación bacteriana.

Fase 3. Inmunotipificación.

Las células obtenidas se sometieron a las técnicas de inmunohistoquímica tanto el día 0 (al tomar las muestras) como al alcanzar conteos mayores de 1´000.000 de células en los cultivos (semanas 3-4), realizando extendidos en láminas para la tinción y procesamiento, utilizando los marcadores preestablecidos en el protocolo para determinar la expresión de p63 y Ki-67.

Técnicas para examinar el fenotipo.

Para examinar el fenotipo epitelial se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica con un panel de anticuerpos monoclonales para detección de p63 y Ki-67 en el Servicio de Patología del Hospital Militar Central según el siguiente protocolo:

- Los tejidos se fijaron en Formol al 10% tamponado para mejores resultados de la técnica

- Se aplicaron normas de seguridad para manipular los reactivos según las Fichas Técnicas.
- Se verificó la fecha de vencimiento de los reactivos a emplear (Hoja de Control de Reactivos)
- Los reactivos fueron adecuadamente rotulados y refrigerados los que así lo requieran
- Se prepararon previamente las láminas y las soluciones a usar el día que se realizó la técnica
- Se rotularon con claridad las soluciones preparadas que se requirió almacenar y /o emplear.
- Se identificaron los bloques de tejido que se usaron como Controles de la técnica en los anticuerpos que lo requirieron.

DESCRIPCIÓN:

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

1. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES A USAR

1.1 REACTIVOS A USAR

- Peróxido de Hidrogeno
- Agua Destilada
- Cloruro de Sódio
- Tween 20
- Fosfato de Sodio Dibasico
- Fosfato de Sodio Monobásico

1.2 PREPARACION DE LA SOLUCION DE PBS LISTO PARA USAR

MATERIALES

- Wash Buffer 10X 100 ml

- Agua Destilada 900 ml

PREPARACION

- Mezclar los 100 ml de wash buffer en los 900 ml de agua destilada. Almacenar en la nevera.

1.3 PREPARACION DE SOLUCION STOCK DE PBS CON SALES

MATERIALES

- Fosfato de sodio dibásico 57gr
- Fosfato de sodio monobásico 13.5gr
- Cloruro de sodio 420gr
- Agua Destilada 5000ml

PREPARACION

- Pesar todas las sales y en 2000 ml de agua destilada poner a hervir hasta que se disuelvan completamente obteniendo una mezcla homogénea y transparente.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir posteriormente 3000ml de agua destilada.
- Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

1.4 PREPARACION DE LA SOLUCION TRABAJO DE PBS CON SALES

- Medir 100 ml de la solución Stock y añadir 900ml de agua destilada.
- Mezclar bien y añadir 7 gotas de Tween 20 a la solución, agitar muy bien y conservar en la nevera.

1.5 PREPARACION DEL CITRATO BUFFER, TARGET RETREVIAl SOLUTION PH 6 Y 9 O SOLUCION

RECUPERADORA DE ANTIGENOS PARA INMUNOHISTOQUIMICA

MATERIALES

- Citrato buffer, recuperador de antígenos o target retrieval solution pH 6 y 9 100ml
- Agua destilada 900ml

PREPARACION

- Mezclar las dos soluciones y conservar en la nevera.

1.6 PREPARACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO al 3%

MATERIALES

- Peróxido de Hidrogeno al 30% 10 ml
- Agua destilada 90 ml

PREPARACION

- Se mezcla preparando la cantidad necesaria antes de usar

2. PREPARACION DE LAMINAS CON POLI - L- LISINA

2.1 REACTIVOS A USAR

- Alcohol Isopropilico
- Acido clorhídrico
- Agua corriente
- Poly-L-Lisina

2.2 PREPARACION DEL ALCOHOL ACIDO 10%

MATERIALES

- Alcohol Isopropilico 210ml

- Agua corriente 90ml
- Ácido Clorhídrico 30ml

PREPARACION

- Mezclar todo y colocar en un recipiente debidamente rotulado listo para ser utilizado.

2.3. PREPARACION DE LA POLI- L LISINA

MATERIALES

- Poli L- Lisina 30ml
- Agua corriente 300ml

PREPARACION

- Mezclar todo y colocar en un recipiente debidamente rotulado listo para ser utilizado.

2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LAS LAMINAS CON POLY-L-LISINA

- Colocar las láminas en las canastillas
- Sumergir la canastilla en el recipiente de la solución de alcohol acido previamente preparada por 5 minutos.
- Lavar las láminas en agua caliente por 5 minutos
- Escurrir muy bien las láminas y colocar en el horno a una temperatura de 60 a 80 °C aproximadamente.
- Dejar enfriar las láminas a temperatura ambiente y posteriormente colocar en el recipiente de la solución de Poli-L-Lisina por 5 minutos.
- Dejar escurrir muy bien las láminas y colocar en el horno hasta que estén bien secas.
- Dejar enfriar las laminas a temperatura ambiente, colocarlas en cajas debidamente marcadas

3. REGISTRO DIARIO DE LA INMUNOHISTOQUIMICA

- Se lleva un formato el cual se llena diariamente con la fecha en que se realiza la inmunohistoquímica, quién es el responsable de realizar la inmunohistoquímica, el número del frasco del anticuerpo a utilizar, el nombre del anticuerpo, la cantidad de láminas, el número del caso, la dilución que se requiere según el inserto, la cantidad del anticuerpo y la cantidad de diluyente.

4. CORTES PARA INMUNOHISTOQUIMICA

- Los tejidos son procesados en el procesador de tejidos e incluidos
- Se realizan los cortes en el micrótopo de 2 a 4 micras de espesor
- Se extiende la tira de parafina que contiene el tejido en el baño de flotación el cual contiene agua destilada a una temperatura de 40 a 50°C.
- Se pesca el tejido en una lámina con Poli-L-Lisina tratada previamente.
- Se rotula la lámina con el número del quirúrgico al que corresponde y el marcador del anticuerpo que se requiere.
- Las láminas se van colocando en una canastilla por marcadores y se coloca en el horno a desparafinar toda la noche a una temperatura de 60 a 70°C.

5. PREPARACION DILUCIONES DEL ANTICUERPO PRIMARIO

- Se toman los frascos con el número correspondiente al anticuerpo que se va a utilizar
- Cada Anticuerpo contiene un inserto el cual especifica la dilución que se debe utilizar
- Se organizan los frascos según como van las láminas en un soporte

- Se toman las micropipetas, cada una con una punta desechable y se toma la cantidad de diluyente que se necesita para cada una de los anticuerpos.
- Se descartan las puntas utilizadas anteriormente con el diluyente, y se van colocando puntas desechables limpias en la micropipeta para cada uno de los anticuerpos, los cuales van quedando en el frasco al cual corresponden.
- Para cada tejido al cual se le realizara la técnica, se deben preparar 100 Lambdas de la dilución recomendada

6. TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

- Se retiran las láminas del horno y se colocan en 2 baños de xiloles en la batería para inmunohistoquímica cada uno por 5 minutos.
- Se pasa las láminas posteriormente a 2 baños de alcoholes cada uno por 3 minutos realizando pases pausados.
- Se precalienta la vapórela con agua destilada y el citrato buffer, Target Retrieval Solution o recuperador antigénico pH 6 o 9 por 10 minutos
- Se retiran las laminas de los alcoholes y se lava con agua corrien para retirar el exceso de alcohol. Posteriormente se lava con agua destilada realizando pases varias veces.
- Se colocan en una canastilla de forma vertical y se introduce en el citrato previamente precalentado en la vaporera y se deja en la misma por 45 minutos.
- Se sacan las laminas de la vapórela directamente a un recipiente con agua destilada.
- Es muy importante no dejar secar las láminas en ningún momento de la técnica.
- Se colocan las láminas en el peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos.
- Colocar en solución de PBS por 5 minutos.

- Secar el exceso de PBS de cada una de las láminas y hacer un círculo con el lápiz hidrofóbico alrededor del tejido.
- Colocar en la cámara húmeda y aplicar la solución de ULTRA V BLOCK por 5 minutos.
- No lavar, retirar el exceso y aplicar sobre el ULTRA V BLOCK el anticuerpo primario previamente preparado por 45 minutos. Antes de aplicar se recomienda realizar varias pipeteadas para así mezclar muy bien el anticuerpo con el diluyente.
- Lavar con solución de PBS para retirar el anticuerpo primario y dejar en un copplin con PBS por 3 minutos.
- Retirar el exceso de PBS, colocar en la cámara húmeda y aplicar el ENHANCER por 20 minutos.
- Lavar con solución de PBS para retirar el ENHANCER y dejar en un copplin con PBS por 3 minutos.
- Retirar el exceso de PBS, colocar en la cámara húmeda y aplicar el POLYMERO por 30 minutos
- Lavar con solución de PBS para retirar el POLYMERO y dejar en un copplin con PBS por 3 minutos.
- Preparar la solución de DAB por 1ml de diluyente se añade 1 gota de cromógeno.
- Retirar el exceso de PBS colocar en la cámara húmeda y aplicar 2 o 3 gotas de DAB según el tejido, a medida que se vayan tiñendo los tejidos se descarta la DAB en un frasco con hipoclorito, y se lava la lamina con agua corriente dejándola en una canastilla.
- Se lavan bien y se colocan en Hematoxilina por 10 minutos.
- Lavar con agua corriente muy bien.
- Hacer 3 o 4 pases por agua amoniacal.
- Lavar con agua corriente muy bien

- Realizar de 6 a 10 pases por 2 alcoholes
- Realizar de 6 a 10 pases por 2 xiloles
- Montar con resina sintética
- Rotular con el número del caso, el especialista a quien pertenece y el nombre del anticuerpo.
- Se pasa un formato al especialista encargado de revisar la inmunohistoquímica el cual contiene: fecha en que se realizó la inmunohistoquímica a revisar, nombre del responsable de la inmunohistoquímica, nombre de especialista quien hizo el control de la inmunohistoquímica, número del caso, nombre de los marcadores que se realizaron y observaciones.
- Después de ser aprobada la técnica en cada una de las láminas se entregan al respectivo residente y/o especialistas para su diagnóstico.
- Cada uno de los formatos se archivan en carpetas debidamente rotuladas.
- De igual manera se tienen los insertos de cada uno de los anticuerpos en carpetas según el distribuidor que haya facilitado los anticuerpos al Servicio de patología del HOSPITAL MILITAR CENTRAL.

Fase 4. Recolección de resultados

Se realizaron pruebas cada tercer día para evaluar el crecimiento, contaminación posible y viabilidad del tejido. Se realizó registro fotográfico de todos los cultivos de células madre obtenidas del tejido de limbo corneo escleral. Los resultados de la inmunotipificación fueron leídos por el personal experto del servicio de patología del Hospital Militar Central y reportados a grupo de investigadores.

7. PLAN DE ANÁLISIS

Se escriben los hallazgos del cultivo de Células Madre de Limbo corneoescleral, comparando los perfiles de crecimiento y proliferación en los cultivos suplementados con Suero Bovino Fetal y los suplementados con Lisado de Plasma Rico en Plaquetas.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se rige bajo las normas de investigación en Colombia de acuerdo al Capítulo VI de la Resolución 8430 de 1993. Es un estudio experimental en laboratorio médico-científico. No se trasplantarán tejidos a seres vivos. Las muestras de limbo corneo escleral serán obtenidas del Banco de Ojos, debidamente registrado y legalizado para el manejo y distribución de estos tejidos, perteneciente a la Red de Trasplantes y se rige bajo el Decreto 2493 de agosto de 2004 y la Resolución 2640 del 2005.

9. CRONOGRAMA

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fase del proyecto												
Realización del protocolo	X											
Aprobación	X	X										
Convenio para la obtención de ojos		X										
Toma de muestras		X	X	X	X							
Siembra de células				X	X	X	X	X				
Evaluación y seguimiento				X	X	X	X	X	X			
Evaluación final										X		
Análisis de resultados										X	X	
Presentación de hallazgos											X	
Publicación											X	X

10. PRESUPUESTO

Financiación:

a. STEM Medicina Regenerativa

b. Convocatoria del HMC en el 2012 para el área de medicina regenerativa.

RUBROS	CONVOCATORIA	CONTRAPARTIDA	TOTAL
PERSONAL	NO FINACIABLE	13.000.000	13.000.000
EQUIPO	NO FINACIABLE	68.142.000	68.142.000
MATERIALES	1.686.000	0	1.686.000
REACTIVOS	12.094.925	5.183.540	17.278.465
SALIDAS DE CAMPO	0	0	0
BIBLIOGRAFÍA	0	0	0
PUBLICACIONES	1.000.000	0	1.000.000
SERVICIOS TÉCNICOS	1.000.000	0	1.000.000
TOTAL	15.780.925	86.325.540	102.106.465

EQUIPO	STEM MEDICINA REGENERATIVA
Baño Serologico	310.000
Cryomed Freezer	7.210.000
Cryo Plus Liquid Nitrogen Sistema de Almacenamiento	3.886.000
Refrigerador	7.750.000
Congelador -80	3.050.000
180 liter Ln2 Supply Tank	3.060.000
Incubadora	2.300.000
Balanza Digital	230.000
Balanza de triple brazo	100.000
Microscopio invertido	2.300.000
Micropipeta 100-1000ul	25.000
Micropipeta 10-100 ul	58.000
Micropipeta 0,5 - 10ul	58.000
Incubadora	5.000
Citometro de flujo BD	10.000.000
Equipo de manipulación de tejidos	2.000.000
Selladora termica	2.000.000
Cabina de flujo laminar	6.000.000
Centrifuga	2.000.000

Termociclador	1.800.000
LigthCycler 480	14.000.000
TOTAL	68.142.000

11. RESULTADOS

Se llevó a término el cultivo de explantes de 5 anillos corneoesclerales con conteos celulares mayores de 1´000.000 de células, logrando una adecuada proliferación celular y observando un patrón de crecimiento muy similar al comparar los 2 suplementos utilizados (LPRP o el SBF), con similares patrones de proliferación y confluencia celular.

Al realizar la inmunohistoquímica encontramos que uno de los tejidos cultivados no expresó ningún marcador tanto en el LPRP como en el SBF. El perfil de expresión de los marcadores en los 4 tejidos restantes se muestra en la **Tabla 1**.

	Suero Bovino Fetal		Lisado Plasma Rico en Plaquetas	
	p63	Ki-67	p63	Ki-67
Tejido # 1	(-)	65%	(-)	80%
Tejido # 2	(-)	60%	(-)	5%
Tejido # 3	(-)	(-)	(-)	60%
Tejido # 4	(-)	50%	(-)	10%

Tabla 1. Perfil de expresión p63 y Ki-67

Biopsias iniciales: (fig.7)

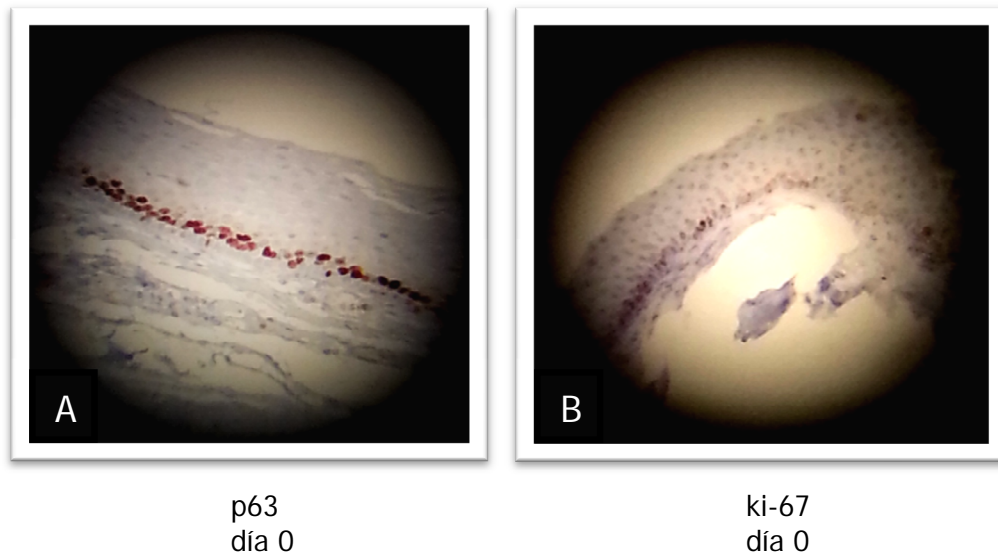
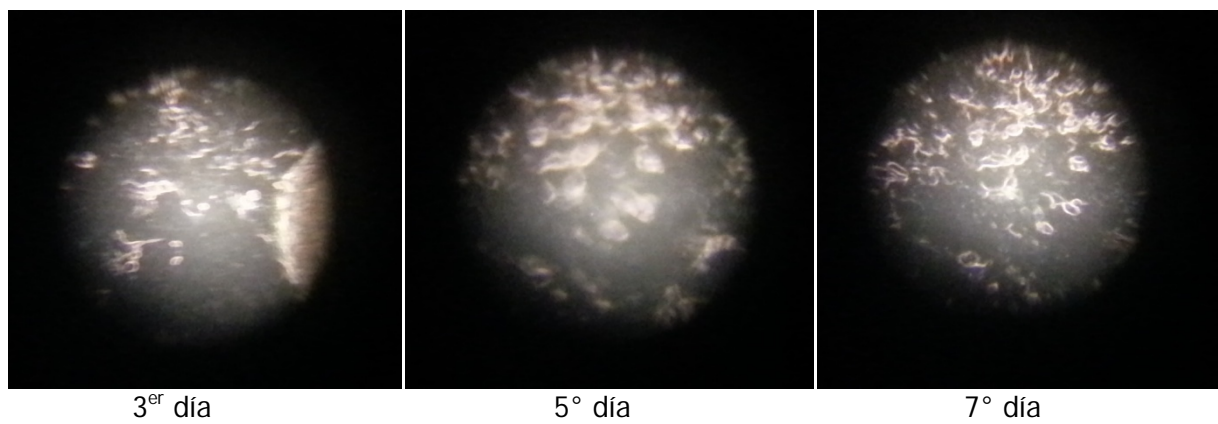


Figura 7.

Inmunohistoquímica realizada el día 0 de las biopsias tomadas de limbo corneoescleral. Marcación nuclear del p63 de las células madre presentes en el tejido (A). Marcación nuclear de células basales y suprabasales con potencial proliferativo Ki-67 (B)

Seguimiento de los cultivos:



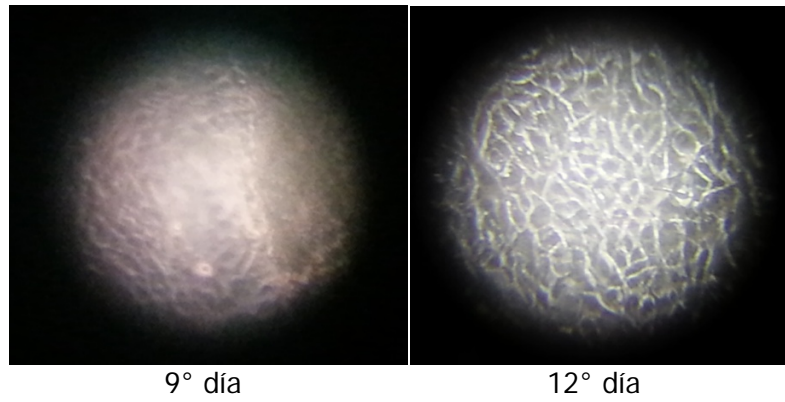


Figura 6.
Seguimiento microscópico de los cultivos

Extendidos (semana 4) (fig. 8)

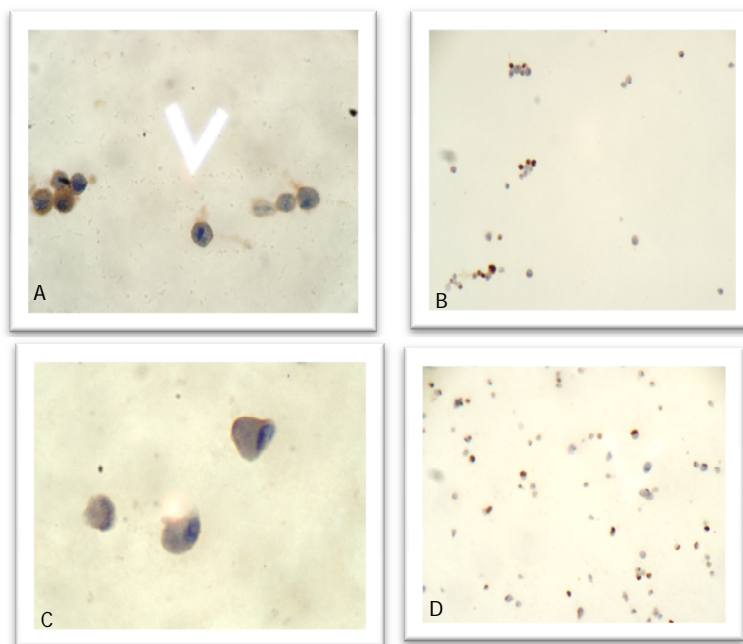


Figura 8.
Inmunohistoquímica realizada a las 4 semanas de cultivo. p63 en extendido de cultivo suplementado con SBF (A). Ki-67 en extendido de cultivo suplementado con SBF (B). p63 en extendido de cultivo suplementado con LPRP (C). Ki-67 en extendido de cultivo suplementado con LPRP (D)

12. DISCUSIÓN

El perfil de crecimiento de las CM de limbo corneoescleral cultivadas ex vivo que encontramos en nuestro trabajo, utilizando el LPRP como suplemento y así mismo comparándolo con el SBF es similar al de otros trabajos reportados en la literatura, teniendo en cuenta el tiempo entre la siembra del explante y el inicio de la migración de las células desde él, el tiempo que se toma la formación de una monocapa de células y la velocidad de proliferación celular.

El trasplante de células madre cultivadas ex vivo se está usando como tratamiento para una gran variedad de condiciones, cuyas indicaciones no están claramente definidas aún. Se requiere aún mayor investigación en cuanto a las indicaciones de trasplante y de las técnicas de cultivo (20) sobre todo en países en vía de desarrollo. Las CM cultivadas sobre membrana amniótica y sobre plástico tienen el mismo patrón de expresión de marcadores celulares (24). En concordancia con lo encontrado por Shahdadfar y cols. en su estudio con cultivos suplementados con suero humano, un medio de cultivo sin aditivos de crecimiento derivados de animales o de cultivos de células animales y con suero humano como único suplemento para el crecimiento, puede servir como equivalente al suero bovino fetal que se utiliza convencionalmente para la expansión ex vivo de CM de limbo esclerocorneal. (24)

La mayoría de los estudios publicados, reportan los resultados de eficacia según la resolución de la disfunción de CM limbares, en términos de reepitelización corneal y/o resolución de la vascularización corneal, conjuntivalización corneal, inflamación, cicatrización, dolor, fotofobia y opacidad corneal. Las definiciones de éxito, varían entre estudios. La resolución de la disfunción de CM limbares se alcanzó luego de trasplante de CM limbares cultivadas entre el 70 – 100% de los ojos. (19).

Al igual que lo encontrado en nuestro trabajo, las células con marcación positiva para p63 disminuyeron luego de largo tiempo en cultivo (a partir de la 3ª semana) como lo reportaron Joseph A y cols en su trabajo en el 2004. (21)

El rechazo del trasplante de CM de limbo corneoescleral cultivadas ex vivo es del 4% en algunos estudios. (19)

Los principales riesgos derivados del trasplante de CM limbares cultivadas son la transmisión de infecciones por parte del donante y las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión. El evento adverso que se ha reportado más consistentemente tras el trasplante de CM limbares cultivadas fue la infección bacteriana, ocurriendo entre un 7 – 15% (19).

Hasta donde se logró revisar en la literatura, no se encontró la utilización de LPRP humano para el cultivo de células de limbo corneoescleral. Consideramos que sería un suplemento adecuado para el cultivo de CM de limbo corneoescleral aptas para trasplante en pacientes con insuficiencia limbar.

13. CONCLUSIONES

En nuestro estudio las CM de limbo corneoescleral cultivadas ex vivo mostraron un patrón de crecimiento similar en el LPRP y el SBF, así mismo el perfil inmunohistoquímico fue similar. Esto aporta una alternativa para disminuir la carga antigénica proveniente de las proteínas animales de los cultivos de CM.

El LPRP demostró ser tan bueno como el SBF para el soporte y mantenimiento de células madre de limbo corneoescleral.

Se hace evidente la necesidad de ampliar esta investigación con un mayor número de muestras de tejido viable, con el fin de perfeccionar las técnicas de cultivo y lograr en un futuro utilizar suplementos de origen humano y eliminar la proteína animal en los medios de cultivo.

14. RECOMENDACIONES

Se requiere la ampliación de este estudio con el fin de recolectar más muestras de tejido para cultivo, para así comprobar significativamente que el LPRP es un suplemento viable para el soporte y mantenimiento de las CM obtenidas de limbo corneoescleral.

Consideramos importante, como estudio consecutivo, el implante de las células cultivadas ex vivo suplementadas con LPRP, en pacientes con disfunción limbar y pérdida de la transparencia de la cornea, para de esta manera comprobar la viabilidad de dichas células en la práctica clínica para el beneficio de nuestros pacientes.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buratto L, Slade S, Serrao S, and Lombardo M. PRK: The Past, Present, and Future of Surface Ablation. Slack Incorporated. ISBN: 1617110434 (PART I. Chapter 1: The Corneal Surface)
2. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2008, Vol. 31, No 1, enero-abril.
3. Yamamoto N, Hirano K, Kojima H, Sumitomo M, Yamashita H, Ayaki M, Taniguchi K, Tanikawa A, Horiguchi M. Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal* (2010) 46:774–780.
4. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, and De Luca M. Location and Clonal Analysis of Stem Cells and Their Differentiated Progeny in the Human Ocular Surface. *The Journal of Cell Biology*, Volume 145, Number 4, May 17, 1999 769–782.
5. Nieto-Miguel T, Calonge M, De la Mata A, López-Paniagua M, Galindo S, Fideliz de la Paz M, Corrales R. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Molecular Vision* 2011; 17:2102-2117.
6. Senoo M, Pinto F, Crum C and McKeon F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* 129, 523–536, May 4, 2007.
7. Grueterich M, España E, and Tseng S. Connexin 43 Expression and Proliferation of Human Limbal Epithelium on Intact and Denuded Amniotic Membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, January 2002, Vol. 43, No. 1.
8. Watanabea K, Nishidaa K, Yamatob M, Umemotob T, Sumidea T, Yamamotoa K, Maedaa N, Watanabea H, Okanob T, Tanoa Y. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, Room E7, Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-0871, Japan Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan. *FEBS Letters* 565 (2004) 6–10
9. Mochizuki H, Fukui M, Hatou S, Yamada M, Tsubota K. Evaluation of ocular surface glycocalyx using lectin-conjugated fluorescein. *Clinical Ophthalmology* 2010;4 925–930.
10. STEM CELLS, An Interactive Qualifying Project Report, Submitted to the Faculty of WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE.
11. Gris Castellón O. Trasplante de Memb amniótica en patología de la superficie ocular. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2004.
12. Chen JJ, et al. 1990, Huang AJ, et al. 1991

13. The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop 2007 (DEWS) – Definition and Classification.
14. Brodovsky S, McCarty C, Snibson G, Loughnan M, Sullivan L, Daniell M, Taylor H, Management of Alkali Burns, An 11-year Retrospective Review. 2000 by the American Academy of Ophthalmology. Published by Elsevier Inc.
15. Jiaxu Hong, MD, Ting Qiu, MD, Angi Wei, MD, Xinghuai Sun, MD, PhD, Jianjiang Xu, MD, PhD. Clinical Characteristics and Visual Outcome of Severe Ocular Chemical Injuries in Shanghai. 2010 by the American Academy of Ophthalmology. Published by Elsevier Inc.
16. Chie Sotozono, Mayumi Ueta, Noriko Koizumi, Tsutomu Inatomi, Yuji Shirakata, Zenro Ikezawa, Koji Hashimoto, Shigeru Kinoshita. Diagnosis and Treatment of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis with Ocular Complications. 2009 by the American Academy of Ophthalmology. Published by Elsevier Inc.
17. HS Dua, A Joseph, VA Shanmuganathan and RE Jones. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye* (2003) 17, 877–885.
18. Harminder S. Dua and Augusto Azuara-Blanco. Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Survey of Ophthalmology*. Volume 44 number 5 march – april 2000.
19. National Institute of Health and Clinical Excellence, Scotland. Tissue-cultured limbal stem cell allograft transplantation for regrowth of corneal epithelium. April 2007.
20. Shweta Sharma, MSc, Radhika Tandon, MD, Sujata Mohanty, PhD, Namrata Sharma, MD, Vanathi M, MD, Seema Sen, MD, Seema Kashyap, MD, and Neeta Singh, PhD. Culture of Corneal Limbal Epithelial Stem Cells: Experience From Benchtop to Bedside in a Tertiary Care Hospital in India. *Cornea* Volume 00, Number 0, Month 2011.
21. A Joseph, A O R Powell-Richards, V A Shanmuganathan, H S Dua. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:393–398.
22. Fatima A, Sangwan VS, Iftekhar G, Reddy P, Matalia H, Balasubramanian D, Vemuganti GK. Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med* October 2006 Vol 52 Issue 4.
23. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F. Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental Eye Research* 81 (2005) 247–264.
24. Shahdadfar A, Haug K, Pathak M, Drolsum L, Olstad O, Johnsen E, Petrovski G, Moe M, Nicolaissen B. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. *Experimental Eye Research* 97 (2012) 1-9.