



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

ANA ESMERALDA OLIVEIRA GUEDES COSTA

***EXPANSÃO EX VIVO DE
CÉLULAS ESTAMINAIS LÍMBICAS***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE OFTALMOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR JOAQUIM NETO MURTA**

COIMBRA, JUNHO 2011

EXPANSÃO EX VIVO DE CÉLULAS ESTAMINAIS LÍMBICAS

Ana Esmeralda Oliveira Guedes Costa

Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia
dos Hospitais da Universidade de Coimbra

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

esmeraldaguedes@gmail.com

Rua Gago Coutinho nº 89 4ºD, 3030-326 Coimbra

Coimbra, Junho 2011

ÍNDICE

PREÂMBULO	3
RESUMO	5
INTRODUÇÃO	7
I. Células estaminais - o que são	9
II. Insuficiência límbica e transplantes de limbo	15
DESENVOLVIMENTO	19
I. Expansão ex vivo de células estaminais	21
Fontes celulares	22
Substratos e transportadores	25
Meio de cultura	29
Sistemas de cultura	30
Avaliação do enxerto celular	31
II. Metanálise das séries clínicas publicadas	33
Casuística	36
Protocolo de expansão	37
Avaliação do enxerto celular	37
Técnica cirúrgica e protocolo terapêutico pós-operatório	38
Resultados	40
III. Enquadramento legal, instalações e recursos humanos	56
CONCLUSÃO	59
AGRADECIMENTOS	63
BIBLIOGRAFIA	65

PREÂMBULO

A expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas afigura-se como uma técnica muito promissora no tratamento da insuficiência límbica.

Existe o interesse da parte do Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra em implementar esta técnica, pelo que tem vindo a criar condições para concretizar este projecto.

Nos últimos dois anos, foi-me dada a oportunidade de visitar dois grandes centros europeus no Reino Unido especializados neste tipo de terapêutica, onde pude acompanhar algumas fases desta técnica a nível laboratorial, bem como os resultados da sua aplicação clínica em alguns doentes.

O LV Prasad Eye Institute, em Hyderabad, na Índia é outra instituição de referência mundial em Oftalmologia. É um centro clínico com uma forte componente de investigação e possui grande experiência na expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas, tendo sido estabelecido um protocolo de colaboração inter-institucional estreita, que já permitiu o intercâmbio de profissionais.

A nível institucional, estão a ser criadas condições para a implementação desta técnica, em articulação com os Serviços Farmacêuticos.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3T3** linhagem celular de fibroblastos de rato embrionários (referência a protocolo “*3-day Transfer, inoculum 3 x 10⁵ cells/20 cm²”*)
- ABCG2** *ATP-binding cassette sub-family G member 2*
- ADN** ácido desoxirribonucleico
- AV** acuidade visual
- Ck** citoqueratina
- CLAL** *conjuntival-limbal allograft*; alotransplante de conjuntiva e limbo
- CLAU** *conjuntival-limbal autograft*; autotransplante de conjuntiva e limbo
- CSA** ciclosporina A
- Cx** conexina
- DALK** *deep anterior lamellar keratoplasty*; queratoplastia lamelar anterior profunda
- DMEM** *Dulbecco’s modified Eagle’s medium*; meio de Eagle modificado por Dulbecco
- EGF** *epidermal growth factor*; factor de crescimento epidérmico
- HEPA filter** *high efficiency particulate air filter*; filtro de partículas aéreas de elevada eficiência
- HBSS** *Hank’s balanced salt solution*; solução salina balanceada de Hank
- KGF** *keratinocyte growth factor*; factor de crescimento de queratinócitos
- KLAL** *kerato-limbal allograft*; alotransplante querato-límico
- KLAU** *kerato-limbal autograft*; autotransplante querato-límico
- LC** lente de contacto
- MA** membrana amniótica
- MHC** *major histocompatibility complex*; complexo *major* de histocompatibilidade
- NGF** *nerve growth factor*; factor de crescimento neuronal
- p63** proteína de 63KDa que regula a transcrição celular
- PCR** *polymerase chain reaction*; reacção em cadeia de polimerase
- PTK** *phototherapeutic keratectomy*; queratectomia fototerapêutica
- QL / QP** queratoplastia lamelar / penetrante
- SA** soro autólogo
- SBF** soro bovino fetal
- TGF** *transforming growth factor*; factor de crescimento transformador
- VEGF** *vascular endothelial growth factor*; factor de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

Introdução: O tratamento da insuficiência límbica é um verdadeiro desafio. Os transplantes querato-límbicos heterólogos, utilizados até hoje, apresentam taxas elevadas de falência e/ou rejeição a curto e médio prazo e requerem imunossupressão agressiva e prolongada. Por sua vez, os autotransplantes a partir do olho adelfo, pelas suas dimensões, têm risco de insuficiência límbica do leito dador, além de que raramente são possíveis. As mais recentes técnicas de expansão *ex vivo* de células estaminais a partir de uma pequena amostra límbica são promissoras, pois têm menor carga imunogénica e em algumas circunstâncias podem ser obtidas a partir do próprio doente.

Objectivo: Rever as várias técnicas de expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas, os recursos materiais e humanos necessários e analisar os resultados do transplante destas células no tratamento da insuficiência límbica.

Desenvolvimento: Foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre técnicas de expansão *ex vivo* de células estaminais e resultados da sua aplicação clínica no tratamento de insuficiência límbica. Constatou-se uma grande heterogeneidade entre as várias séries. Vários estudos clínicos demonstram a sua eficácia, com melhores resultados nos transplantes autólogos ($p < 0,05$). Os traumatismos químicos ou térmicos têm melhor prognóstico e o síndrome de Stevens-Johnson apresenta piores resultados. Não existe um protocolo de expansão óptimo e a tendência actual é substituir os derivados animais do meio de cultura. Apesar da eficácia clínica, o seu mecanismo de acção é desconhecido.

Conclusão: O transplante de células estaminais límbicas expandidas *ex vivo* é eficaz. Os transplantes autólogos têm maior eficácia que os alógenos. A etiologia tem influência sobre o resultado.

Palavras chave: expansão celular *ex vivo*, insuficiência límbica, células estaminais límbicas, meta-análise.

ABSTRACT

Introduction: The treatment of limbal insufficiency is particularly challenging. Keratolimbal allografts present high failure and/or rejection rates in short-to-medium term and require aggressive and prolonged immunosuppression. Autografts obtained from the fellow healthy eye are prone to limbal insufficiency in the donor site and are seldom possible. Recently, *ex vivo* stem cell expansion and transplantation have been developed. They are obtained from a small limbal biopsy, are less immunogenic and sometimes can be obtained from the patient himself.

Purpose: To review the techniques of *ex vivo* stem cell expansion, the facilities and staff requirements and to analyse the results of their transplantation in the treatment of limbal insufficiency.

Development: A literature search was performed regarding *ex vivo* stem cell expansion and the results of their clinical application in the treatment of limbal insufficiency. There is a great variability between series. Several clinical studies demonstrate the efficacy of this technique, with better results in autografts ($p < 0,05$). Chemical or thermal injuries have better prognosis and Stevens-Johnson syndrome present worse outcomes. There is no optimal expansion protocol and there is a trend towards replacing animal-derived products from the culture medium. Despite its clinical efficacy, its mechanism of action is unknown.

Conclusions: The transplantation of *ex vivo* cultured limbal stem cells is effective in the treatment of limbal insufficiency. Autografts are more effective than allografts. The etiology of limbal insufficiency has influence on the results.

Keywords: *ex vivo* cell expansion, limbal insufficiency, limbal stem cells, meta-analysis.

INTRODUÇÃO

I. CÉLULAS ESTAMINAIS - O QUE SÃO

Células estaminais são células indiferenciadas capazes de proliferar, automanter-se, originar progénie de células diferenciadas e regenerar os tecidos (Takács 2009, Potten 1990). Habitualmente encontram-se num estado quiescente, apresentando ciclos celulares longos e baixa actividade mitótica, o que de alguma forma lhes confere protecção contra danos genéticos (Dua 2000a, Grueterich 2003b, Takács 2009). Perante estímulos adequados, são capazes de se replicar, auto-renovando a população de células estaminais ao mesmo tempo que originam células-filhas mais diferenciadas, que vão perdendo a capacidade de se replicarem, originando os tecidos.

Há vários tipos de células estaminais. As únicas células estaminais verdadeiramente totipotentes são as do zigoto e mórula, pois cada uma, por si só, permite originar todos os tecidos e órgãos de um organismo (Watt 2010). A partir deste estágio, vão perdendo a capacidade de originar qualquer tecido. O blastocisto é composto por células estaminais embrionárias, que são apenas pluripotentes, isto é, estão acometidas a uma das linhagens embrionárias: ectoderme, mesoderme e endoderme. À medida que se formam os vários órgãos, as células estaminais tornam-se multi ou unipotentes, isto é, células precursoras indiferenciadas de um tecido particular (Watt 2010).

Todos os tecidos que se regeneram têm uma população de células estaminais que, em teoria, deverão persistir durante toda a vida do indivíduo (Dua 2000a). Várias evidências clínicas e laboratoriais apontam para que as células estaminais precursoras do epitélio corneano se localizem no limbo (Schermer 1986, Ebato 1987, Ebato 1988, Cotsarelis 1989, Sharma 1989, Kurpakus 1990, Lindberg 1993, Chen 1990, Chen 1991, Huang 1991, Takács 2009). Esta hipótese foi sugerida pela primeira vez em 1971 por Davanger e Evensen, após observarem que a migração epitelial no processo de cicatrização de úlceras corneanas era centrípeta (Davanger 1971). A presença de células estaminais na base do epitélio límbico foi equacionada por Schermer *et al.* (1986) e mais tarde Cotsarelis *et al.* (1989) detectou células “*label-retaining*” na camada basal do epitélio límbico, isto é, células que, graças ao seu ciclo celular longo e baixo índice de replicação, mantém timidina tritiada incorporada no

seu ADN por longos períodos (Cotsarelis 1989). Estas células apresentam um fenótipo indiferenciado (Fernandes 2004), comprovado pela ausência de marcadores de diferenciação epitelial como as citoqueratinas Ck3 e Ck12 (Schermer 1986, Kurpakus 1990) e demonstram um comportamento de célula estaminal em cultura, pois têm maior potencial proliferativo do que as células do epitélio central da córnea ou do que as células do epitélio conjuntival (Pellegrini 1997, Ebato 1988). Experiências animais e evidências clínicas mostraram que a remoção ou ausência do limbo resulta em re-epitelização insuficiente e conjuntivalização da córnea (Chen 1990, Chen 1991, Huang 1991); por outro lado, o transplante de limbo permite o restabelecimento do epitélio corneano (Espana 2004). O facto de a maioria dos tumores da superfície ocular terem origem na região límbica também é um dado a favor da localização de células estaminais indiferenciadas a este nível (Waring 1984, Sudesh 2000).

No entanto, um estudo recente (Majo 2008) põe em causa a localização exclusiva destas células no limbo, ao demonstrar a presença de células com potencial regenerativo dispersas em toda a córnea em vários mamíferos, inclusivé em dois bebés humanos. Por sua vez, Dua *et al.* (2009) verificou que em situações de insuficiência límbica total, comprovada clinicamente e à microscopia confocal, uma ilha de epitélio central pode manter-se durante vários anos. Este facto sugere que a homeostase do epitélio corneano em condições fisiológicas pode não depender do limbo, sendo provável a existência de células com potencial proliferativo no epitélio do centro da córnea. Estes achados são corroborados por estudos em animais (Barrandon citado por Dua 2009), que mostraram que a córnea central se mantém transparente após destruição do limbo a 360°, que as células do limbo só migram para o centro da córnea se o epitélio central for lesado e que o transplante de epitélio do centro da córnea permite o restabelecimento da superfície corneana.

A localização exacta, no limbo, do nicho de células estaminais precursoras do epitélio corneano tem sido objecto de intensa investigação. A ausência de marcador específico destas células dificulta o seu reconhecimento (Shortt 2007b, O'Sullivan 2007). Actualmente pensa-se que o nicho se encontra ao nível das palissadas de Vogt, que são projecções

papilares de tecido conjuntivo com disposição radiária, recobertas por 4 a 5 camadas de células epiteliais (Figuras 1 e 2). Entre elas existem projecções verticais de epitélio estratificado, com cerca de 15 camadas celulares, que constituem as *rete ridges* (Townsend 1991). As células estaminais límbicas seriam uma sub-população de células basais das *rete ridges* e desse epitélio que recobre as palissadas (Cotsarelis 1989, Dua 2000a, Wolosin 2000).

As palissadas de Vogt possuem algumas características que as torna um excelente local para albergar estas células. A sua localização profunda no estroma confere protecção dos agentes externos (Takacs 2009). São mais proeminentes no limbo inferior e superior (Townsend 1991), onde estão protegidas pela acção mecânica das pálpebras. Contêm melanócitos, o que confere protecção da radiação ultravioleta (Cotsarelis 1989, Schlötzer-Schrehardt 2005, Patel 2006, Hayashi 2007) e estão em íntima relação com uma rede vascular que fornece nutrientes (Townsend 1991, Chen 2004) (Figura 2).



Figura 1. Palissadas de Vogt
(aspecto biomicroscópico)

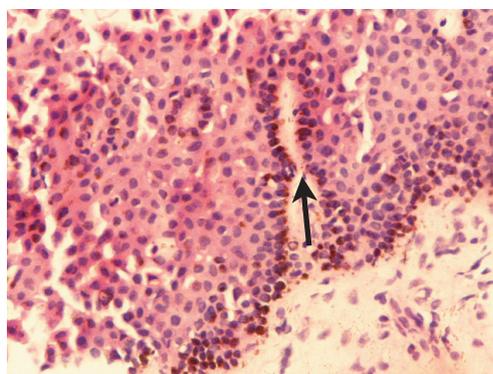


Figura 2. Palissada de Vogt (seta) (HE; 10x); são visíveis melanócitos na camada basal do epitélio límbico.

Na presença de um estímulo adequado, as células estaminais entrariam em divisão celular, originando células amplificadoras transitórias (TAC). Estas são células intermédias, mais diferenciadas, com potencial proliferativo limitado (Grueterich 2003b), que vão migrar centripetamente e reconstruir o epitélio corneano, como postulado por Thoft na sua “X, Y and Z hypothesis” (Thoft 1983).

No entanto, Dua *et al.* (2005), ao analisar histologicamente a microanatomia do limbo, descreveu as criptas epiteliais límbicas [*limbal epithelial crypts* (LEC)] como presumível fonte de células estaminais. Estas são constituídas por cordões celulares que se projectam a partir da superfície inferior das *rete ridges* para a periferia. Podem ter disposição radiária ou circunferencial e existem em número limitado no limbo de adultos (cerca de 6), não tendo sido identificadas em bebés (Yeung 2009). Segundo este autor, este local seria o nicho de células estaminais e as células encontradas na base do epitélio que recobre as palissadas seriam já células amplificadoras transitórias (TAC).

Apesar de inúmeros estudos, apenas há evidências indirectas de que as células precursoras do epitélio corneano se localizam no limbo, não existindo actualmente nenhum marcador específico conhecido (O'Sullivan 2007, Shortt 2007b).

	Epitélio da córnea		Epitélio do limbo		Epitélio da conjuntiva	
	Basal	Suprabasal	Basal	Suprabasal	Basal	Suprabasal
Ck3 / Ck12	++	++	-	+	-	-
Ck5 / Ck14	- (ou +)	-	+	±	++	-
Ck19	-	-	++	-	±	++
Vimentina	-	-	++	±	-	-
ΔNp63α	-	-	+	-		
Cx 43	++	+	-	+	-	-
ABCG2	-	-	++	-	-	-

-, negativo; ± positividade fraca; +, positividade moderada; ++, fortemente positivo;

Tabela 1. Localização de marcadores celulares no epitélio da córnea, limbo e conjuntiva.

Para fins experimentais, testa-se um painel de marcadores moleculares através de técnicas de imunocitoquímica (tabela 1). As citoqueratinas (Ck) Ck4, Ck15 e Ck19, a vimentina, o factor de transcrição ΔNp63α (uma das seis isoformas da proteína p63) e a proteína de transporte transmembranar ABCG2 são marcadores positivos, pois são

encontrados em maiores concentrações, embora não de forma exclusiva, a nível da camada basal do epitélio límbico (Di Iorio 2005, Schlötzer-Schrehardt 2005). Pelo contrário, os marcadores negativos identificam outros tipos celulares, como é o caso de Ck3, Ck12 e da conexina (Cx) 43, que são marcadores de diferenciação do epitélio corneano (O'Sullivan 2007, Schermer 1986, Kurpakus 1990). Actualmente, os mais usados são Δ Np63 α e ABCG2 (positivos) e Ck3 e Ck12 (negativos). No entanto, esta é uma área em permanente investigação e novos potenciais marcadores estão constantemente a ser objecto de estudo.

Morfológicamente, e à semelhança de outras células estaminais, são células pequenas, com cerca de 10 μ m de diâmetro (Romano 2003), com razão núcleo/citoplasma elevada (Takacs 2009). Podem ser identificadas à microscopia confocal na base do epitélio que recobre as palissadas, apresentando-se mais pequenas e mais densas do que as células supra-basais ou do que as do epitélio corneano central (Romano 2003, Kobayashi 2005, Shortt 2007a) (Figura 3). A combinação da presença de marcadores positivos e ausência de marcadores negativos associada a morfologia típica é tida como indicativo da sua existência (Schlötzer-Schrehardt 2005, O'Sullivan 2007, Takacs 2009).

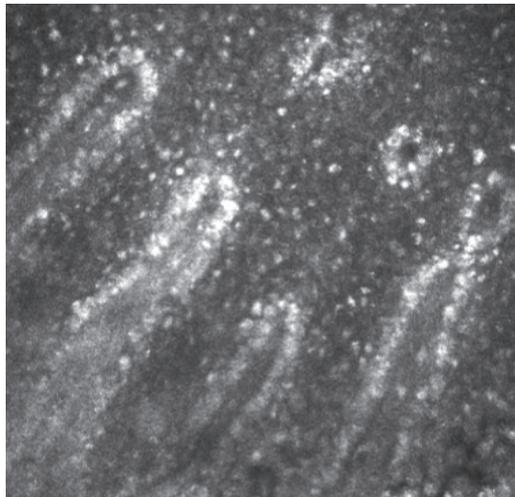


Figura 3. Palissadas de Vogt à microscopia confocal, recobertas por uma camada de células hiperreflectivas (presumíveis células estaminais).

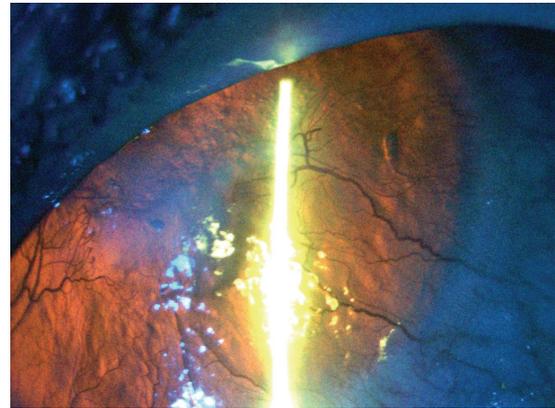
A função das células estaminais é largamente influenciada pelo microambiente em que se insere: o nicho (Shortt 2007a). O contacto intercelular, a interacção com a matriz

extra-celular, o meio local e factores de crescimento parecem ser fundamentais para regular a actividade destas células (Grueterich 2003b). Inclusivamente, a diferente composição da membrana basal do limbo posterior, anterior e da córnea central tem sido apontada como possível responsável pelo diferente fenótipo e comportamento celular (célula estaminal, célula amplificadora transitória e célula epitelial) (Grueterich 2003b, Espana 2003, Schlotzer-Schrehardt 2007). O conhecimento detalhado do nicho poderá, pois, permitir recriar um ambiente propício ao desenvolvimento *ex vivo* das células estaminais límbicas (Schlötzer-Schrehardt 2007).

II. A INSUFICIÊNCIA LÍMBICA E OS TRANSPLANTES DE LIMBO

O limbo é uma estrutura da superfície ocular (entidade anatomo-funcional) responsável pela regeneração do epitélio corneano e pelo estabelecimento de uma barreira entre o epitélio da córnea e da conjuntiva (Ahmad 2010). Quando é lesado, surge uma condição clínica denominada insuficiência límbica, que se caracteriza por neovascularização e conjuntivalização da córnea, defeitos epiteliais persistentes e recorrentes e inflamação crónica (Dua 2000b). É uma situação, em muitos casos, altamente incapacitante, não só pelo compromisso visual, como pelo desconforto que condiciona. Os sintomas incluem diminuição da visão, fotofobia, lacrimejo, blefarospasmo e episódios recorrentes de dor (Dua 2000b).

O diagnóstico é fundamentalmente clínico, mas pode ser confirmado histologicamente, através da identificação de células caliciformes na citologia de impressão, da detecção de um padrão de marcadores conjuntivais por técnicas de imuno-histoquímica ou pela morfologia característica à microscopia confocal (Dua 2000b, Dua 2009).



Figuras 4.1. e 4.2. Insuficiência límbica em doente com aniridia (iluminação difusa e retroiluminação). Visível a neovascularização da córnea e a opacidade central.

A insuficiência de células estaminais límbicas pode ser classificada quanto à sua etiologia em primária ou secundária (Dua 2000b, Espana 2004). É primária quando existe

uma perda gradual de células estaminais não atribuída a factores externos identificáveis. Pensa-se que existe uma anomalia do microambiente estromal que o torna incapaz de sustentar as células estaminais, como a aniridia, a queratopatia neurotrófica e a limbite crónica. É secundária quando um factor externo destrói as células límbicas, como é o caso dos traumatismos químicos e térmicos, do síndrome de Stevens-Johnson, do pênfigo cicatricial ocular e do uso de lentes de contacto.

O tratamento depende fundamentalmente da gravidade da insuficiência límbica e do atingimento uni ou bilateral (Dua 2000b, Ahmad 2010). Algumas situações de insuficiência límbica parcial e periférica, em particular quando não há compromisso visual nem defeitos epiteliais recorrentes ou persistentes, podem não necessitar de qualquer tratamento. Noutras, o desbridamento mecânico do epitélio conjuntival associado ou não a transplante de membrana amniótica pode ser suficiente. Casos mais graves, em particular os de insuficiência límbica total, requerem transplante de limbo autólogo ou alógeno consoante o atingimento seja uni ou bilateral, respectivamente. Estes enxertos límbicos podem ser sustentados por conjuntiva (*Conjuntival limbal auto/allograft* - CLAU ou CLAL) ou por tecido corneano (*Keratolimbal auto/allograft* - KLAU ou KLAL).

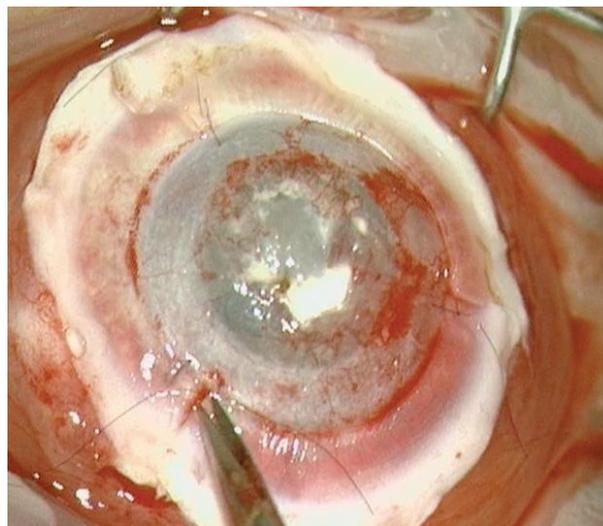


Figura 5. Aspecto per-operatório de KLAL. Enxertos límbicos posicionados sobre o limbo receptor, antes do recobrimento com membrana amniótica.

Os transplantes de dador vivo, sejam autólogos ou de dador vivo relacionado, apresentam risco de insuficiência límbica iatrogénica do leito dador, uma vez que é excisado limbo numa extensão considerável (Dua 2000b, Espana 2004, Nguyen 2008). Por seu lado, os alo-transplantes apresentam risco elevado de rejeição e falência, dada a presença de células de Langerhans e a sua natureza vascular, requerendo imunossupressão sistémica (Espana 2004). De facto, os resultados a médio-longo prazo têm-se revelado decepcionantes, contrariando a expectativa criada em torno dos bons resultados iniciais (Espana 2004). Num estudo retrospectivo realizado no Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, *Rosa et al.* (2008) verificou que dos 15 KLAL realizados, 60% apresentavam falência do enxerto, com um tempo de seguimento médio de 12 meses. Salienta-se que 8 dos 11 transplantes efectuados por queimadura química (73%) apresentaram falência de resposta ao tratamento.

Por esse motivo, têm vindo a ser desenvolvidas técnicas de expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas, que permitem obter enxertos com grande quantidade de células a partir de uma pequena biópsia límbica (1x1 mm), minimizando o risco de insuficiência límbica da zona dadora (Pellegrini 1997). Além disso, estes enxertos são provavelmente menos imunogénicos, dado que o número de células apresentadoras de antígeno após cultura é diminuto (Auböck 1988).

DESENVOLVIMENTO

I. EXPANSÃO CELULAR EX VIVO

A expansão celular *ex vivo* tem aplicação clínica há décadas no tratamento de queimaduras cutâneas extensas. As técnicas para cultura baseiam-se nos trabalhos pioneiros de Rheinwald e Green na década de 70, em que conseguiram expandir queratinócitos humanos a partir de pequenas amostras de pele em cultura com fibroblastos de rato irradiados 3T3 (substrato ou *feeder layer*) (Rheinwald 1975). Com base nestes trabalhos, Pellegrini *et al.* em 1997 descreve pela primeira vez o uso de células estaminais límbicas autólogas expandidas *ex vivo* no tratamento de dois doentes com insuficiência límbica total unilateral. Desde então, vários autores tem publicado a sua experiência com auto e alotransplantes de células cultivadas *ex vivo*, tanto a partir de dadores vivos relacionados como de dadores cadáveres, e múltiplas variações desta técnica têm sido descritas.

De uma forma simples, há duas técnicas principais: a cultura em suspensão, em que é necessária a digestão enzimática prévia do tecido dador para libertar as células, e a cultura por explante em que a biópsia é colocada directamente sobre uma superfície onde irá aderir, sem qualquer tratamento prévio (Shortt 2008).

Em ambos os casos, colónias celulares obtêm-se após 2-3 semanas de cultura em atmosfera controlada de CO₂ a 5% a uma temperatura de 37°C, usando um meio de cultura adequado (Pellegrini 1997, Meyer-Blazejewska 2010). A técnica original envolve a cultura com fibroblastos de rato inactivados (3T3). Em alternativa aos fibroblastos, tem sido usada a membrana amniótica. A co-cultura com 3T3 e membrana amniótica em simultâneo ou em fases subsequentes também pode ser utilizada (Ang 2007, Koizumi 2001a, Koizumi 201b, Nakamura 2003, Nakamura 2004a, Nakamura 2006, Schwab 1999, Schwab 2000, Shimazaki 2007). Adicionalmente, a cultura de células pode ser sujeita a um processo denominado *airlifting*, que consiste na exposição ao ar da colónia de células, submersa em meio de cultura, para promover a estratificação, diferenciação e adesão intercelular (Fatima 2006, O'Sullivan 2007, Meyer-Blazejewska 2010).

A evolução da expansão celular é acompanhada por microscopia de contraste de fase. No processo de cultura em suspensão, as células estaminais formam colónias que se depositam no fundo do recipiente e vão coalescendo e afastando os fibroblastos para a periferia (Shortt 2008). Quando se usa um explante, as células podem ser observadas a migrar a partir dele (Li 2007, Shortt 2008). No caso de cultura em membrana amniótica, as células vão crescendo sobre ela (Fatima 2006, Shortt 2008). O aspecto final é o de uma colónia de células pequenas, compactas e uniformes, com uma razão núcleo-citoplasma 1:1, formando uma monocamada que cresce sobre os restos celulares da membrana amniótica (Grueterich 2002a).

Quando as colónias de células se encontram confluentes, procede-se ao transplante. Quando a cultura decorre sobre membrana amniótica, a própria membrana é o transportador, sendo transplantada para o leito receptor (Tsai 2000). Nos restantes casos, tem de se proceder à libertação enzimática das células e colocá-las num transportador, dada a fragilidade do enxerto (Pellegrini 1997).

A. Fontes celulares

A expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas é particularmente útil nas situações de insuficiência límbica unilateral, pois permite a realização de transplantes autólogos com um risco mínimo para o leito dador e evita a necessidade de imunossupressão.

Nas situações de insuficiência límbica total bilateral, o tratamento passa por alo-enxerto, seja de dador vivo relacionado, seja de dador cadáver. Ambos requerem imunossupressão, mesmo nos casos de dadores histocompatíveis em que a probabilidade (teórica) de rejeição é menor (Rao 1999, Fernandes 2004). Pensa-se que as células de Langerhans presentes no tecido dador (apresentadoras de antígenos) são o estímulo *major* do processo de rejeição (James 2001). Sabe-se que o número de células de Langerhans presentes em tecidos frescos é muito maior e que diminui com o tempo de armazenamento,

sendo praticamente inexistentes ao fim de 14 dias armazenadas em banco de olhos (Pels 1984, Holland 1987, Ardjomand 1998). Por outro lado, desconhece-se a viabilidade das células límbicas nestas circunstâncias. Há, inclusivamente, recomendações para serem usadas no máximo até 72h *post-mortem* no caso de alotransplante querato-límbico (Croasdale 1999). No entanto, James *et al.* (2001) demonstrou que é possível obter culturas celulares a partir de anéis córneo-esclerais armazenados até 25 dias, embora seja mais fiável e rápido obtê-las a partir de tecidos frescos. Adicionalmente, mostrou haver uma tendência para olhos de doadores mais velhos serem menos eficazes, embora não atingindo níveis de significância estatística. Alguns autores sugerem ainda que as células de Langerhans são eliminadas após cultura *ex vivo*, o que diminui o estímulo para rejeição (Auböck 1988).

A1. Fontes celulares alternativas

A possibilidade de recorrer a fontes celulares alternativas facilmente acessíveis alarga o espectro de aplicação terapêutica desta técnica. Por um lado, deixa de estar condicionada pela disponibilidade de tecido ocular. Por outro, a utilização de outras células estaminais autólogas expandidas *ex vivo* pode tornar-se alternativa aos aloenxertos límbicos.

O reconhecimento de que o comportamento celular é modulado pelo microambiente em que se insere permitiu investigar as potencialidades de outras células estaminais adultas humanas, como as da mucosa oral (Nakamura 2004b, Nishida 2004, Inatomi 2006a, Inatomi 2006b, Ang 2006), da polpa dentária (Gomes 2010), do epitélio da conjuntiva (Tanioka 2006, Di Girolamo 2009) e da medula óssea (Ma 2006).

A reconstrução da superfície ocular a partir de células da mucosa oral em humanos foi descrita pela primeira vez por Nakamura *et al.* em 2004. É eficaz no restabelecimento de uma superfície ocular estável e regular, com melhoria da acuidade visual (Nakamura 2004b, Nishida 2004, Inatomi 2006a, Inatomi 2006b, Ang 2006). No entanto, o mecanismo de acção

ainda não está esclarecido. Sabe-se apenas que o epitélio mantém o imunofenótipo original da mucosa oral (Ck3, Ck4 e Ck13 positivas), não apresentando sinais de transdiferenciação em epitélio corneano (Ck12 é negativa) (Inatomi 2006b, Ang 2006, Nakamura 2007, Madhira 2008). A principal limitação desta técnica é a neovascularização periférica que induz, que tem um pico entre os 3 e os 6 meses (Nakamura 2004b, Inatomi 2006a).

À exceção dos trabalhos com células da mucosa oral, que têm aplicação clínica, os restantes são estudos de experimentação animal e com tempos de seguimento curtos, de apenas algumas semanas. Além disso, não apresentam provas conclusivas à cerca do fenótipo epitelial final. De salientar que Ma *et al.* (2006), no seu trabalho com células mesenquimatosas da medula óssea, demonstrou que o epitélio transplantado não adquire fenótipo corneano, ao contrário do que ocorre com células estaminais límbicas, apesar de ambos serem eficazes. Já o transplante de membrana amniótica desprovida de células estaminais, isolada ou associada a fibroblastos de rato, não é eficaz. Assim, sugere que a inibição da inflamação e da angiogénese mediada pelo enxerto celular poderá ter um papel preponderante no sucesso terapêutico.

Outra potencial fonte autóloga são as células estaminais pluripotentes induzidas, que se obtêm reprogramando células adultas (Reza 2011). No entanto, não há, até ao momento, estudos sobre a sua utilidade na regeneração do epitélio corneano ou seus precursores.

As células estaminais embrionárias, dada a sua pluripotencialidade, constituem uma opção lógica. Estudos em ratos mostraram que são passíveis de indução em progenitores epiteliais corneanos (Homma 2004). No entanto, apresentam elevada tumorigenicidade, risco de rejeição imunológica e a sua diferenciação é de difícil controlo (Reza 2011). Além disso, o seu uso em humanos levanta questões éticas (Reza 2011).

Recentemente, foi demonstrado que células estaminais derivadas do cordão umbilical apresentam um padrão de marcadores moleculares semelhante ao das células límbicas, pelo que foi investigado com sucesso o seu papel na reconstrução da superfície ocular em animais (Reza 2011). Estas células não expressam MHC da classe II, pelo que

são pouco imunogénicas. Ao contrário das células embrionárias, são altamente proliferativas, não são tumorigénicas e o seu uso não levanta problemas éticos (Reza 2011).

B. Substratos e transportadores

A manutenção de uma cultura de células epiteliais requer uma camada nutriente *feeder-layer* (substrato) (Rheinwald 1975). Rheinwald e Green (1975) usaram com sucesso fibroblastos de rato inactivados para cultivar queratinócitos e muitos dos estudos com células estaminais límbicas expandidas *ex vivo* utilizam estes fibroblastos para estabelecer sistemas de cultura. No entanto, o uso de produtos animais não é isento de riscos, como o de transmissão de vírus. Foi também demonstrado que células estaminais embrionárias humanas nessas circunstâncias desenvolvem a expressão de glicoproteínas animais (Martin 2005, Heiskanen 2007) e a presença destes xeno-alergenos pode desencadear rejeição, pelo que se têm investigado substratos alternativos, dos quais a membrana amniótica humana tem sido o mais apelativo.

B1. Membrana amniótica

A membrana amniótica tem propriedades anti-angiogénicas, anti-inflamatórias, antibióticas e antivíricas, promove a epitelização, inibe a fibrose e apresenta baixa ou nenhuma imunogenicidade (Dua 2004, Gomes 2005, Fernandes 2005, Grueterich 2003b). Algumas destas características, em particular a capacidade de diminuir a inflamação e fibrose e de promover a epitelização, motivaram o seu uso em oftalmologia (Shortt 2009). O sucesso na reconstrução da superfície ocular, nomeadamente em situações de insuficiência límbica, e as semelhanças moleculares com o nicho límbico fez com que fosse usada como substrato para expansão *ex vivo* de células estaminais (Takacs 2009, Grueterich 2003b). Pensa-se que desempenha ainda funções protectoras e que pode actuar como membrana basal, servindo de suporte ao crescimento e migração celular e inibindo a apoptose (Dua 2000a, Grueterich 2003b).

Muitos autores usam a membrana amniótica humana na expansão *ex vivo* de células estaminais, havendo grande heterogeneidade nas técnicas descritas (Grueterich 2003b, Shortt 2007b, Shortt 2008, Baylis 2011). A membrana pode ser usada intacta ou total ou parcialmente desepitelizada. Quando desepitelizada, promove um crescimento celular mais rápido e dá origem a células mais diferenciadas, que estratificam e aderem ao estroma da membrana (Koizumi 2000, Chen B 2010). Já a membrana intacta permite obter células mais indiferenciadas, sendo, portanto, mais eficaz na manutenção do fenótipo de célula estaminal (Grueterich 2002b, Grueterich 2003a, Shortt 2009, Chen B 2010). A importância da preservação do epitélio foi realçada por Chen *et al.* (2007), ao demonstrar que as células epiteliais isoladas a partir da membrana amniótica humana são capazes de manter uma cultura de células estaminais límbicas, à semelhança dos fibroblastos murinos. Num estudo que comparou sistemas com membrana amniótica com *versus* sem epitélio, não foram encontradas diferenças na morfologia final da cultura celular, sugerindo que a membrana se vai desnudando à medida que a cultura de células vai progredindo (Raeder 2010). No entanto, este estudo incluía, para além do período de 2 a 3 semanas de cultura, um período adicional de armazenamento em cultura de órgãos, e talvez por isso os resultados fossem semelhantes. Também não há consenso quanto à melhor forma de desepitelizar a membrana: digestão enzimática, tratamento químico, ou abrasão mecânica (Raeder 2010, Zakaria 2010).

A influência do método de conservação da membrana amniótica foi avaliada por Shortt *et al.* (2009), que demonstrou que a membrana conservada em preparações contendo glicerol era menos eficaz, provavelmente devido ao facto de as células epiteliais serem destruídas nesse meio. Segundo os autores, a criopreservação a -80°C em HBSS apenas (*Hank's balanced salt solution*) é superior, permitindo a obtenção de células com uma melhor morfologia e uma maior proporção de células positivas para $\Delta\text{Np63}\alpha$ e ABCG2. No mesmo estudo, demonstraram também que os antibióticos usados no processo de desinfecção da membrana não são tóxicos para o epitélio.

Para além de ser um produto de origem humana, a membrana amniótica tem a vantagem adicional de ser um transportador que pode ser transplantado para o olho receptor. Pelo contrário, quando as colónias de células se formam sobre uma superfície (ex: as paredes do recipiente), é necessária digestão enzimática para as libertar, o que pode ser lesivo, e colocá-las num suporte físico que permita o seu transporte para o leito receptor. Para fazer face às dificuldades no manuseamento da membrana amniótica, foi desenvolvido um sistema de fixação com um duplo anel, o *interlockable amnion ring*, que mantém a membrana orientada e sob tensão, o que facilita a sua manipulação durante a cultura, o transporte e a cirurgia (Zakaria 2010).

A cultura sobre membrana amniótica humana representa um importante avanço no sentido de estabelecer sistemas sem produtos animais. No entanto, sendo um produto biológico, não é standardizado (Zakaria 2010). As suas características variam entre dadoras e entre as várias gestações da mesma dadora, o que certamente afecta a eficácia. Numa tentativa de atenuar estas diferenças, Zakaria *et al.* (2010) propõe a desepitelização e remoção do estroma sistemáticas para eliminar factores de crescimento e obter uma espessura mais fina e uniforme.

Outro inconveniente do uso da membrana amniótica prende-se com a necessidade de rastreio de doenças infecciosas, que é dispendioso e não evita totalmente a transmissão de alguns agentes (Notara 2010). Além disso, a disponibilidade pode restringir o seu uso. Estes aspectos têm motivado o estudo de substratos e transportadores alternativos.

B2. Substratos alternativos

A presença de um substrato numa cultura epitelial é indispensável para preservar as células estaminais (Rheinwald 1975, Rama 2001, Nguyen 2008). Vários substratos alternativos aos fibroblastos murinos têm sido investigados, demonstrando eficácia sobreponível. Tal é o caso das células epiteliais da membrana amniótica humana (Chen 2007), dos fibroblastos fetais (Notara 2007b, Zhang 2010) e das células da medula óssea

(Omoto 2009). Existe ainda descrito um sistema engenhoso “auto-feeder” que promove a proliferação faseada de fibroblastos do explante límbico e, mais tarde, das células estaminais límbicas, através da combinação de dois meios de cultura distintos (Varghese 2010). Apesar de promissores, estes substratos não têm, até ao momento, aplicação clínica conhecida. Além disso, apenas um é totalmente livre de produtos animais (Notara 2007b). Os restantes recorrem ao uso de soro fetal bovino (Chen 2007, Omoto 2009, Zhang 2010) ou extracto pituitário bovino (Varghese 2010).

Há estudos com aplicação clínica que utilizam sistemas de expansão *ex vivo* sem 3T3 e que demonstram sucesso clínico, o que aparentemente contraria a obrigatoriedade de usar um substrato (Tsai 2000, Grueterich 2002c, Sangwan 2003, Sangwan 2005a, Sangwan 2005b, Sangwan 2006, Fatima 2007, Kawashima 2007, Shimazaki 2007, Shortt 2008, Di Girolamo 2009, Gomes 2009, Baradaran-Rafii 2010, Kolli 2010, Pauklin 2010). Constata-se, contudo, que estes sistemas utilizam a membrana amniótica com epitélio e/ou cultura por explante. Talvez as células epiteliais da membrana ou a presença de células do explante límbico funcionem como substrato.

É provável que o futuro passe pelo uso de fibroblastos humanos (Takacs 2009). Existe já um sistema livre de produtos animais, em que a expansão celular se obtém através da cultura com fibroblastos embrionários humanos sem recurso a soro fetal bovino (Notara 2007b). No entanto, trata-se de um estudo experimental, sem aplicação clínica conhecida.

B3. Transportadores alternativos

Para além da eliminação de produtos animais, o sistema de expansão *ex vivo* ideal deve permitir uma fácil mobilização, manipulação e transporte da frágil colónia celular. É, pois, conveniente utilizar uma estrutura de suporte que evite a libertação enzimática e, simultaneamente, seja transportável e transplantável.

São várias as substâncias que têm sido propostas como veículo de transporte do enxerto celular. A membrana amniótica, já referida, é o que tem maior aplicação clínica. A

possibilidade de cultura sobre lente de contacto (Schwab 1999, Notara 2007a, Di Girolamo 2009, Notara 2010), gel de fibrina (Rama 2001, Di Iorio 2010, Gisoldi 2010, Rama 2010), matriz de colagénio comprimida (Mi 2010), cápsula anterior do cristalino (Galal 2007) ou Myogel (Francis 2009), um extracto da matriz extracelular humana obtida de tecido muscular, foi também investigada.

Apenas a cultura sobre lente de contacto e sobre gel de fibrina foi aplicada em humanos, revelando sucesso (Schwab 1999, Rama 2001, Di Girolamo 2009, Di Iorio 2010, Gisoldi 2010, Rama 2010). Dos restantes, a utilização de Myogel suscita particular interesse, pois trata-se de um derivado humano que aparentemente funciona como substrato e suporte, originando células com fenótipo indiferenciado (Francis 2009).

Existe ainda um sistema de cultura sobre um polímero responsivo a temperatura (Nishida 2004) que aumenta o seu grau de hidratação abaixo dos 30°C, e assim promove o destacamento das células evitando a digestão enzimática. Dessa forma, permite obter um enxerto celular sem suporte que é colocado directamente na superfície ocular, onde adere sem suturas ou cola. Este sistema foi já aplicado em humanos (Nishida 2004). A sua principal desvantagem é o uso de fibroblastos murinos.

C. Meio de cultura

Na maioria dos trabalhos publicados, sejam experiências animais ou séries com aplicação clínica, o meio de cultura é composto por uma mistura de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e Ham's F12, em proporções que variam de 1:1 a 4:1, suplementada com soro bovino fetal ou soro autólogo humano (5-20%), toxina da cólera, factores de crescimento, hormonas (insulina, hidrocortisona, triiodotironina), aminoácidos (glutamina), antibióticos e antifúngicos (penicilina, estreptomicina, gentamicina, anfotericina B), entre outros.

Meyer-Blazejewska *et al.* (2010) investigou a influência de vários parâmetros na eficácia do sistema de cultura em suspensão com 3T3 inactivados. Concluiu que os melhores meios de cultura são os que contêm baixa concentração de cálcio, pois altos níveis promovem a diferenciação. Demonstraram que a concentração óptima do soro fetal bovino é 10% e que os factores de crescimento mais eficazes são o epidérmico (EGF), o de queratinócitos (KGF) e o factor de crescimento transformador (TGF α), na concentração de 5ng/ml. Investigou ainda o papel de factores neurotróficos, demonstrando que combinação de factor de crescimento neuronal (NGF) com EGF tem um efeito aditivo, aumentando em 3 vezes a taxa de crescimento.

Actualmente, existe uma tendência para desenvolver uma técnica de cultura livre de produtos animais. A substituição do soro bovino fetal por soro autólogo humano representa um avanço nesse sentido e vários trabalhos experimentais e clínicos têm demonstrado que são igualmente eficazes, originando colónias de células com morfologia e fenótipo similares (Ang 2006, Fatima 2006, Nakamura 2006).

D. Sistemas de cultura

Como referido anteriormente, há duas formas de expansão *ex vivo* de células estaminais: cultura em suspensão celular e por explante. Ambas podem ser combinadas com o uso de fibroastos de rato e/ou membrana amniótica ou outros suportes (ex: fibrina, insertos de plástico, etc.) (Shortt 2008, Baylis 2010).

O sistema de cultura através da criação de uma suspensão de células foi o primeiro a ser desenvolvido. Requer a digestão enzimática do tecido com dispase e tripsina para libertar as células, que depois são colocadas em cultura (“single-cell suspension”) (Shortt 2010)

No sistema de cultura por explante, a biópsia é colocada directamente sobre um suporte (membrana amniótica, inserto de plástico, etc). Depois de aderir, é adicionado meio

de cultura (com ou sem fibroblastos de rato) (Shortt 2010). Alguns autores recorrem à digestão enzimática do explante, para facilitar a migração celular (Baradaran-Rafii 2010, Pauklin 2010). No entanto, Varghese *et al.* (2010) mostrou que a digestão enzimática prévia com dispase não é necessária, pois a distância migratória após o 4º dia não é afectada.

Em teoria, a digestão enzimática usada nos sistemas de suspensão e em alguns sistemas de explante pode ser prejudicial, deteriorando as células (Varghese 2010). Por outro lado, a cultura por explante poderá ser vantajosa, na medida em que mantém as células no seu ambiente natural (Ahmad 2010). No entanto, Li *et al.* (2007) demonstrou que algumas células progenitoras migram para o estroma do explante, provavelmente sofrendo transformação mesenquimatosas, o que alerta para a necessidade de optimização dos métodos de cultura.

Na realidade, não há evidências inequívocas sobre a superioridade de um método em relação ao outro. Se por um lado, alguns estudos sugerem que cultura em suspensão é mais eficiente (James 2001, Kim 2004, Zhang 2005), por outro não há evidências de superioridade nos resultados clínicos (Shortt 2008).

E. Avaliação do enxerto

A caracterização do enxerto celular é fundamental para garantir a qualidade do tecido transplantado. Idealmente, dever-se-ia demonstrar a presença de células estaminais. No entanto, não havendo marcador específico, resta demonstrar evidências indirectas da sua existência através de histologia, imunofenotipagem e ensaios funcionais (eficácia na formação de colónias).

O processo de cultura *ex vivo* deve ser acompanhado por microscopia de contraste de fase. A expansão ocorre por confluência de várias colónias, formando uma monocamada que depois estratifica. Alguns autores optam por transplantar esta monocamada confluenta, defendendo a estratificação *in vivo* (Fatima 2007, Sangwan 2005a, Sangwan 2006, Pauklin

2010). Outros preferem transplantar epitélio estratificado, já com algumas características de diferenciação, por ser mais resistente (Pellegrini 1997, Schwab 2000, Tsai 2000, Koizumi 2001a, Daya 2005, Nakamura 2006, Shimazaki 2007, Di Girolamo 2009, Kolli 2010, Rama 2010).

A imunofenotipagem ou imunohistoquímica complementa o exame histológico, através da caracterização celular com recurso a um painel de marcadores. Os mais frequentemente utilizados são as Ck3 e Ck12 como marcadores de diferenciação corneana, as proteínas ABCG2 e Δ Np63 α como presumíveis marcadores de célula estaminal e Ck4 e 13 como marcadores do epitélio da mucosa oral.

A capacidade proliferativa das células epiteliais pode ser avaliada *in vitro*, o que permite classificá-las por ordem decrescente de eficácia na formação de colónias em holoclones (presumíveis células estaminais), meroclones e paraclones (células amplificadoras transitórias) (Pellegrini 1999). A proporção de holoclones assim determinada permite uma melhor caracterização do enxerto. Na prática, a detecção de holoclones não é exequível, pois é um processo demorado que não fornece resultados em tempo útil (Rama 2010). Recentemente, foi demonstrada uma correlação entre a proporção de holoclones e a expressão de Δ Np63 α . Assim, somente os enxertos com um mínimo de 3% de células Δ Np63 α positivas devem ser considerados adequados para transplantação (Rama 2010).

II. METANÁLISE DAS SÉRIES CLÍNICAS PUBLICADAS

Foi feito o levantamento dos estudos publicados até fevereiro de 2011 sobre a aplicação clínica de células estaminais expandidas *ex vivo* para o tratamento de insuficiência límbica. Foram obtidos através da pesquisa na base de dados PubMed com os termos “limbal insufficiency”, “stem cells”, “limbal stem cells”, “ex vivo expansion” e “ocular surface reconstruction” e a partir da análise das referências de outros artigos. Foram considerados apenas os artigos escritos em inglês, português, francês e espanhol.

Existem 37 publicações sobre os resultados clínicos desta técnica no tratamento da insuficiência límbica. A maioria diz respeito à expansão de células límbicas autólogas e/ou alógenas e apenas cinco se referem à utilização de mucosa oral como fonte celular (tabelas 2.1 e 2.2).

Estudo	Nº de olhos	Alo / Auto	Explante / Suspensão	Substrato	Soro	Suporte	Air-lifting	Animal-free
Ang (2007)	1	Alo	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Baradaran-Rafii (2010)	8	Auto	Explante (dispace)	-	SBF	MA desepitelizada	Não	Não
Daya (2005)	10	Alo	Suspensão	3T3	SBF	Disco de plástico	Não	Não
Di Girolamo (2009)	2	Auto	Explante	-	SA	Lente de contacto	Não	?
Di Iorio (2010)	166	Auto	Suspensão	3T3	SBF	Fibrina	Não	Não
Fatima (2007)	1	Auto	Explante	-	SBF/AS	MA desepitelizada	Não	Não
Gisoldi (2010)	6	Auto	Suspensão	3T3	?	Fibrina	Não	Não
Gomes (2009)	1	Alo	Explante	-	?	MA desepitelizada	Não	?
Grueterich (2002c)	1	Auto	Explante	-	SBF	MA intacta	Não	Não
Kawashima (2007)	2 4	Auto Alo	Explante	-	SBF/AS	MA desepitelizada	Não	Não
Koizumi (2001a)	13	Alo	Explante	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Koizumi (2001b)	3	Alo	Explante	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Kolli (2010)	8	Auto	Explante	-	SA	MA intacta	Não	Não **
Meller (2009)	1	Alo	Explante	-	SA	MA intacta	Não	Não **
Nakamura (2003)	3	Alo *	Explante	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não

Estudo	Nº de olhos	Alo / Auto	Explante / Suspensão	Substrato	Soro	Suporte	Air-lifting	Animal-free
Nakamura (2004a)	1	Auto	Explante	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Nakamura (2006)	9	Auto Alo	Explante Suspensão	- 3T3	SA	MA desepitelizada	Sim Sim	Não
Pauklin (2010)	30 14	Auto Alo	Explante (dispase)	-	SA	MA intacta	Não	Não **
Pellegrini (1997)	2	Auto	Suspensão	3T3	SBF	Disco de plástico	Não	Não
Rama (2001)	18	Auto	Suspensão	3T3	SBF	Fibrina	Não	Não
Rama (2010)	107	Auto	Suspensão	3T3	SBF	Fibrina	Não	Não
Sangwan (2003)	2	Auto	Explante	-	SBF	MA desepitelizada	Não	Não
Sangwan (2005a)	11 4	Auto Alo	Explante	-	SBF	MA desepitelizada	Não	Não
Sangwan (2005b)	1 1	Auto Alo	Explante	-	SBF	MA desepitelizada	Não	Não
Sangwan (2006)	88	Auto	Explante	-	SBF/ SA	MA desepitelizada	Não	Não/ Sim
Schwab (1999)	19	Auto Alo	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada ou LC ou colagénio	Não	Não
Schwab (2000)	10 4	Auto Alo	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Shimazaki (2002)	13	Alo	Explante	-	SA	MA desepitelizada	Não	Não **
Shimazaki (2007)	7 20	Auto Alo	Explante	-	SA	MA desepitelizada	Não	Não **
			Suspensão	3T3	SA	MA desepitelizada	Sim	Não
Shortt (2008)	3 7	Auto Alo	Suspensão	-	SBF	MA desepitelizada parcialmente	Não	Não
Thanos (2010)	1	Auto	Explante	-	SBF	MA intacta	Não	Não
Tsai (2000)	6	Auto	Explante	-	SBF	MA intacta	Não	Não

* re-transplante

** apesar de não recorrerem a 3T3 ou soro bovino fetal, têm outros componentes derivados de produtos animais
LC: lente de contacto; MA: membrana amniótica; SA: soro autólogo; SBF: soro bovino fetal;
Séries excluídas da análise de resultados assinaladas a sombreado

Tabela 2.1. Técnica de expansão ex vivo de células estaminais límbicas

Estudo	Nº de olhos	Explante / Suspensão	Substrato	Soro	Suporte	Air-lifting	Animal-free
Ang (2006)	10	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Inatomi (2006a)	15	Suspensão	3T3	SBF/SA	MA desepitelizada	Sim	Não
Inatomi (2006b)	2	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Nakamura (2004b)	6	Suspensão	3T3	SBF	MA desepitelizada	Sim	Não
Nishida (2004)	4	Suspensão	3T3	?	Polímero termo-dependente	Não	Não

Séries excluídas da análise de resultados assinaladas a sombreado

Tabela 2.2. Técnica de expansão ex vivo de células estaminais da mucosa oral

Muitos dos trabalhos referem séries pequenas e apenas cinco apresentam resultados de 20 ou mais casos. Constata-se, contudo, que alguns casos são referidos em mais do que uma publicação, pelo que uma análise criteriosa dos resultados implica anular as duplicações. Nesse sentido, procedemos à exclusão das séries de Ang (2007) e de Koizumi (2001b) por se encontrarem incluídas na série de Koizumi (2001a); das séries de Fatima (2007), de Sangwan (2003) e dos casos de autotransplante da série de Sangwan (2005a) por terem sido referidos por Sangwan (2006); das séries de Kawashima (2007) e de Shimazaki (2002), incluídas na de Shimazaki (2007); dos casos reportados por Meller (2009) e Thanos (2010) por serem referidos por Pauklin (2010); das séries de Nakamura (2004) e de Inatomi (2006b) pois constam da série de Inatomi (2006a). Verificou-se também a duplicação de 3 casos nas séries de Schwab (1999 e 2000) e de 4 casos das séries de Rama (2001 e 2010), tendo sido possível eliminá-los da série com menor tempo de seguimento e corrigir os resultados globais. Optou-se ainda pela exclusão da série de Nakamura (2003) por se tratar de re-transplantes.

A. Casuística

Até à data, foram realizados 588 transplantes de células expandidas *ex vivo* para tratamento de insuficiência límbica, dos quais 559 (95%) obtidos a partir de tecido límbico e os restantes 29 (5%) a partir de mucosa oral. Dos 559 enxertos com origem no limbo, 478 eram autólogos (85,5%) e 81 eram alógenos (14,5%).

A etiologia mais comum foi o traumatismo químico ou térmico, responsável por 73% dos casos (n=427). Outras causas menos frequentes foram o Síndrome de Stevens-Johnson (n=41), pterigium e pseudo-pterigium (n=29) e a iatrogenia (n=16) (tabela 3). O período de seguimento médio variou entre 3 e 35 meses, com um máximo de cerca de 9,5 anos.

Fonte celular	Limbo		Mucosa Oral	
	nº	%	nº	%
Etiologia				
Traumatismo químico ou térmico	418	74,8%	8	28,0%
Pterigium e pseudo-pterigium	29	5,2%		
Síndrome de Stevens-Johnson	26	4,7%	15	52,0%
Iatrogénica (pós-cirurgia, irradiação, mitomicina C)	16	2,9%		
Inflamação crónica / Infecção	14	2,5%		
Aniridia	10	1,8%		
Penfigóide e pseudo-penfigóide cicatricial ocular	9	1,6%	5	17,0%
Displasia ectodérmica	4	0,7%		
Doença do enxerto contra hospedeiro	2	0,4%		
Anomalia de Rieger	1	0,2%		
Distrofia de córnea	1	0,2%		
Úlcera neurotrófica	1	0,2%		
Epidermólise bolhosa	1	0,2%		
Perfuração ocular	1	0,2%		
Desconhecido	26	4,7%	1	3,0%
Total	559	100%	29	100%

Tabela 3. Etiologia

B. Protocolo de expansão

É notória a grande heterogeneidade das técnicas utilizadas (tabela 2). Foi efectuada cultura por suspensão celular em 17 estudos e por explante em 22. Os fibroblastos de rato 3T3 foram utilizados em 20 trabalhos. Nos restantes 17, não há referência a qualquer substrato. Na maioria das séries, a cultura decorreu sobre membrana amniótica humana intacta ou desepitelizada. Outros suportes usados foram: lentes de contacto, fibrina, discos de plástico e polímero responsivo a temperatura. Em 13 séries, as colónias celulares foram submetidas a *air-lifting*.

C. Avaliação do enxerto celular

A maioria dos trabalhos publicados refere a formação de um epitélio estratificado constituído por 3 a 6 camadas, com células basais cubóides, sem células caliciformes (Pellegrini 1997, Schwab 1999, Schwab 2000, Tsai 2000, Rama 2001, Koizumi 2001a, Koizumi 2001b, Shimazaki 2002, Nakamura 2003, Nakamura 2004, Daya 2005, Nakamura 2006, Shimazaki 2007, Kawashima 2007, Di Girolamo 2009, Kolli 2010). Kolli *et al.* (2010) refere ainda que estas células basais apresentam um aspecto indiferenciado, com razão núcleo/citoplasma elevada. Na microscopia electrónica verificou a existência de desmossomas e hemidesmossomas na camada basal e de características morfológicas de diferenciação das células mais superficiais (Kolli 2010).

O fenótipo celular foi avaliado em quinze dos estudos com aplicação clínica, dos quais três utilizaram mucosa oral como fonte celular. Destes, apenas cinco demonstraram a presença de células estaminais no enxerto, através da expressão de ABCG2 e Δ Np63 α (ou p63), (Nishida 2004, Di Girolamo 2009, Di Iorio 2010, Kolli 2010, Rama 2010). Os restantes limitaram-se a demonstrar o fenótipo corneano pela pesquisa de Ck3 e/ou 12 (Pellegrini 1997, Schwab 2000, Koizumi 2001a, Koizumi 2001b, Nakamura 2003, Nakamura 2004, Nakamura 2006, Shimazaki 2007) ou de fenótipo de mucosa oral (Nakamura 2004, Ang 2006).

A percentagem de holoclones foi avaliada em seis dos estudos com aplicação clínica referidos e representa entre 2 e 16% da totalidade dos clones, o que está de acordo com a noção de que as células estaminais são uma subpopulação da camada basal do epitélio límbico (Pellegrini 1997, Schwab 2000, Rama 2001, Nishida 2004, Di Iorio 2010, Kolli 2010).

D. Técnica cirúrgica e protocolo terapêutico pós-operatório

A preparação do leito receptor envolveu a realização de peritomia conjuntival a 360°, com excisão da totalidade do *pannus* neovascular. Alguns autores aplicam mitomicina C 0,05% durante 3-5 minutos (Koizumi 2001a, Nakamura 2004b, Ang 2006, Nakamura 2006, Shimazaki 2007). A hemostase foi conseguida através da aplicação de fenilefrina e da cauterização mínima dos vasos. Em raros casos foram realizados outros procedimentos, como queratoplastia e extracção de catarata (Schwab 2000, Koizumi 2001a, Daya 2005, Nakamura 2006, Pauklin 2010).

Na maioria das séries, o enxerto foi suturado ao limbo e conjuntiva. Pellegrini *et al.* (1997), Di Girolamo *et al.* (2009) e Nishida *et al.* (2004) usam apenas uma lente de contacto para manter o enxerto posicionado.

No período pós-operatório, é fundamental o controlo da inflamação e a profilaxia infecciosa. Nesse sentido, é unânime a utilização tópica de corticosteróide sem conservantes, de antibiótico de largo espectro e de lubrificação abundante sem conservantes. A administração tópica de soro autólogo (Shimazaki 2002, Daya 2005, Shimazaki 2007, Kawashima 2007, Meller 2009, Pauklin 2010, Kolli 2010, Thanos 2010) e de ciclosporina A (Schwab 2000, Shimazaki 2002, Sangwan 2005b, Shimazaki 2007) é referida em algumas séries.

A protecção mecânica do enxerto é também de extrema importância. Na maioria das séries, foi colocada lente de contacto terapêutica e/ou aplicada uma segunda membrana amniótica a recobrir o enxerto no final da cirurgia (Pellegrini 1997, Schwab 1999, Schwab

2000, Tsai 2000, Grueterich 2002c, Nakamura 2003, Nakamura 2004b, Daya 2005, Sangwan 2005a, Sangwan 2006, Nakamura 2006, Shimazaki 2007, Fatima 2007, Shortt 2008, Gomes 2009, Kawashima 2007, Koizumi 2001a, Koizumi 2001b, Kolli 2010). Menos frequentemente, foi realizada tarsorrafia (Rama 2001, Baradaran-Rafii 2010, Gisoldi 2010) ou induzida ptose pela injeção de toxina botulínica (Pauklin 2010). Rama *et al.* (2010) não administra qualquer terapêutica tópica nos primeiros 14 dias, para evitar traumatismo do enxerto.

A instituição de terapêutica imunossupressora sistêmica reveste-se de alguma controvérsia. Não há consenso no que diz respeito às indicações, esquema terapêutico e período de administração.

Em teoria, a imunossupressão sistêmica não é necessária nos autotransplantes. No entanto, verifica-se com alguma frequência o uso de corticosteróide sistêmico nos primeiros dias/semanas após transplante autólogo (Nakamura 2004, Kawashima 2007, Baradaran-Rafii 2010, Gisoldi 2010, Rama 2010). Há ainda um relato de 2 doentes submetidos a autotransplante em que foi administrada ciclosporina sistêmica, por apresentarem neovascularização grave (Kawashima 2007). Nos auto-enxertos de células provenientes da mucosa oral, verifica-se a utilização de corticosteróide sistêmico em três estudos, dos quais um em associação a ciclosporina oral e outro a ciclofosfamida durante cerca de 1-2 meses (Ang 2006, Nakamura 2004b, Nishida 2004).

Nos alotransplantes, é universal a instituição de esquema imunossupressor sistêmico com ciclosporina A, habitualmente associada a corticosteróide (Koizumi 2001a, Koizumi 2001b, Shimazaki 2002, Nakamura 2003, Daya 2005, Sangwan 2005a, Sangwan 2005b, Nakamura 2006, Ang 2007, Shimazaki 2007, Kawashima 2007, Shortt 2008, Meller 2009, Pauklin 2010). Em algumas séries, é associado um terceiro agente, a ciclofosfamida (Koizumi 2001a, Koizumi 2001b, Nakamura 2003, Nakamura 2006, Ang 2007). Apenas num caso não foi prescrita ciclosporina A, optando-se pela manutenção de micofenolato mofetil, que a doente já tomava em razão da sua doença de base (Meller 2009).

Existe uma grande variabilidade quanto à posologia e duração do tratamento, além de que em muitos estudos essas informações não são referidas. Constata-se uma tendência para usar o corticosteróide em desmame por um período curto inicial (variável entre 3 dias até 4-8 semanas) e manter a ciclosporina a médio/longo-prazo (indefinidamente em algumas séries). A ciclosporina A é prescrita em dose fixa e/ou ajustada consoante os níveis séricos alvo (100-150 ng/ml) e eventuais efeitos secundários.

E. Resultados

A avaliação dos resultados é bastante difícil, tendo em conta a heterogeneidade que se verifica entre as várias séries. Certamente não é adequado comparar olhos com diferentes graus de insuficiência límbica e etiologias diversas. Da mesma forma, a variabilidade na fonte celular escolhida, nos protocolos de expansão, na técnica cirúrgica, no protocolo terapêutico pós-operatório e nos critérios de sucesso estabelecidos constituem obstáculos à interpretação dos resultados.

No entanto, e apesar destas limitações, impõe-se uma análise objectiva dos trabalhos publicados. Para tal, analisámos o sucesso na reconstrução da superfície ocular, na resolução de sintomas e na melhoria da acuidade visual, assim como os procedimentos cirúrgicos adicionais, as complicações e os efeitos adversos reportados nas várias séries clínicas.

Foi ainda avaliada a influência de diversas variáveis da técnica utilizada no resultado final, bem como o impacto da etiologia. A análise estatística foi feita através do teste de Chi-quadrado, considerando estatisticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

E1. Reconstrução da superfície ocular

O restabelecimento do fenótipo corneano é o objectivo major deste tratamento, pelo que nos vários estudos é considerado como critério de sucesso a obtenção de um epitélio corneano transparente, estável e regular, sem recorrência de conjuntivalização, neovascularização ou inflamação (Daya 2005, Shortt 2008, Pauklin 2010). No entanto, na maioria dos casos, esta avaliação é qualitativa, subjectiva e examinador-dependente.

Apenas sete estudos usaram métodos objectivos complementares para caracterizar a evolução clínica, como sistemas de pontuação de sinais clínicos (Rama 2001, Kawashima 2007, Pauklin 2010, Baradaran-Rafii 2010), citologia de impressão (Rama 2001, Shimazaki 2007, Shortt 2008, Baradaran-Rafii 2010, Kolli 2010) e microscopia confocal (Shortt 2008). Em alguns casos, foi realizada avaliação histológica e imunohistoquímica do botão de queratoplastia, que comprovou o fenótipo epitelial final (Pellegrini 1997, Grueterich 2002c, Daya 2005, Sangwan 2005a, Fatima 2007, Kawashima 2007, Gisoldi 2010, Kolli 2010, Rama 2010).

As taxas de sucesso das várias séries publicadas são apresentadas nas tabelas 4.1 e 4.2. De entre os estudos publicados, destacam-se quatro pelo número considerável de olhos tratados (Sangwan 2006, Di Iorio 2010, Pauklin 2010, Rama 2010), com taxas de sucesso entre 73% e 80% (autotransplantes). Recentemente, o grupo de Sangwan (L.V. Prasad Eye Institute, Hyderabad, Índia) apresentou uma taxa de sucesso de 61,3% numa actualização da sua casuística (398 olhos submetidos a autotransplante) (comunicação pessoal do Prof. Balasubramanian, 1st Annual Champalimaud Meeting, Coimbra, 16 Junho 2011).

As maiores séries envolvendo alotransplantes, representando casuísticas muito inferiores, foram as de Shimazaki *et al.* 2007 (n=20) e Pauklin *et al.* 2010 (n=14), com taxas de sucesso de 50%.

Estudo	Nº olhos	Alo / Auto	% sucesso	Crítérios de sucesso	Melhoria AV
Ang (2007)	1	Alo	100% (1/1)	Superfície ocular estável	0% (0/1)
Baradaran-Rafii (2010)	8	Auto	88% (7/8)	Superfície ocular estável Sistema de pontuação de sinais Citologia de impressão	88% (7/8)
Daya (2005)	10	Alo	70% (7/10)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	30% (3/10)
Di Girolamo (2009)	2	Auto	100% (2/2)	Superfície ocular estável Sistema de pontuação de sintomas	100% (2/2)
Di Iorio (2010)	166	Auto	80%* (133)	Superfície ocular estável (8 mm centrais)	Não referido
Fatima (2007)	1	Auto	100% (1/1)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	100% (1/1)
Gisoldi (2010)	6	Auto	83% (5/6)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	83% (5/6)
Gomes (2009)	1	Alo	0% (0/1)	Superfície ocular estável	0% (0/1)
Grueterich (2002c)	1	Auto	100% (1/1)	Superfície ocular estável Imunohistoquímica	100% (1/1)
Kawashima (2007)	2 4	Auto Alo	100% (6/6)	Superfície ocular estável Sistema de pontuação da neovascularização Acuidade visual	67% (4/6)
Koizumi (2001a)	13	Alo	77% (10/13)	Superfície ocular estável	38% (5/13)
Koizumi (2001b)	3	Alo	100% (3/3)	Superfície ocular estável	Não referido
Kolli (2010)	8	Auto	100% (8/8)	Superfície ocular estável Citologia de impressão Sistema de pontuação de sintomas	75% (6/8)
Meller (2009)	1	Alo**	100% (1/1)	Superfície ocular estável	0% (0/1)
Nakamura (2003)	3	Alo ***	100% (3/3)	Superfície ocular estável	33% (1/3)
Nakamura (2004a)	1	Auto	100% (1/1)	Superfície ocular estável	100% (1/1)
Nakamura (2006)	2 7	Auto Alo	100% (2/2) 100% (7/7)	Superfície ocular estável	78% (7/9)
Pauklin (2010)	30 14	Auto Alo	76.7% (23/30) 50% (7/14)	Superfície ocular estável Sistema de pontuação de sinais clínicos	73% (32/44)
Pellegrini (1997)	2	Auto	100% (2/2)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	50% (1/2)

Complicações	Procedimentos simultâneos	Procedimentos posteriores	Seguimento (meses)
-	-	-	48 [-]
Perfuração (1) Invasão conjuntival (4) Hipertensão ocular (1) Rejeição QP (5)	-	QP (5) Recobrimento com mucosa oral (1)	34 [6-48]
Queratite infecciosa (1) Invasão conjuntival (5)	Enxerto corneoescleral (1) CLAL dador relacionado (2)	QP / DALK (7) KLAL (5) MA (6) FACO + LIOCP(1)	28 [12-50]
-	-	-	10,5 [8-13]
-	-	QP / QL (33)	?
-	-	-	41 [-]
-	-	QP / QL (4) FACO + LIOCP (1)	24 [11-34]
-	-	-	> 3M
-	-	QP + FACO + LIOCP (1)	21 [-]
Rejeição QP (2)	-	QP / QL (6) FACO + LIOCP (1)	32 [20-44]
Rejeição epitelial (3) Queratite infecciosa (1) Invasão conjuntival (3) Simbléfaro (1)	QL (5)	FACO + LIOCP (2) Novo enxerto (1)	11,2 [9-13]
-	-	-	6 [-]
Invasão conjuntival (3)	-	Epiteliectomia sectorial + MA (3) QP (1)	19 [12-30]
Perfuração	-	QP tectónica + remoção de cílios (1)	31 [-]
-	-	-	12.6 [12-14]
-	-	-	19 [-]
Queratite infecciosa (2)	FACO + LIO (3) QL (1)	-	14.6 [6-20]
Hemorragia sob o enxerto (1) Perfuração (2) Rejeição aguda (1)	QP (3)	QP (8) LIO (5) Bevacizumab sc (11)	28.5 [9-73]
-	-	QP + LIOCA (1)	- / > 24

Estudo	Nº olhos	Alo / Auto	% sucesso	Crítérios de sucesso	Melhoria AV
Rama (2001)	18	Auto	78% (14/18)	Superfície ocular estável Citologia de impressão (imunocitoquímica) Sistema de pontuação de sinais clínicos Melhoria sintomática	50% (7/14)
Rama (2010)	107	Auto	76.6% (82/107)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	62% (66/107)
Sangwan (2003)	2	Auto	100% (2/2)	Superfície ocular estável	50% (1/2)
Sangwan (2005a)	11 4	Auto Alo	93% (14/15)	Superfície ocular estável Sucesso do QP	87% (13/15)
Sangwan (2005b)	1 1	Auto Alo	100% (1/1) 100% (1/1)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática Acuidade visual	100% (2/2)
Sangwan (2006)	78	Auto	73.1% (57/78)	Superfície ocular estável Melhoria sintomática	53% (41/78)
Schwab (1999)	18 2	Auto Alo	76.5% (13/17) 0% (0/2)	Superfície ocular estável	42% (8/19)
Schwab (2000)	10 4	Auto Alo	60% (6/10) 100% (4/4)	Superfície ocular estável Acuidade visual	36% (5/14)
Shimazaki (2002)	13	Alo	46.2% (6/13)	Superfície ocular estável	31% (4/13)
Shimazaki (2007)	7 20	Auto Alo	85.7% (6/7) 50% (10/20)	Superfície ocular estável Citologia de impressão (centro da córnea)	48% (13/27)
Shortt (2008)	3 7	Auto Alo	33% (1/3) 71% (5/7)	Superfície ocular estável Acuidade visual Citologia de impressão Microscopia confocal Melhoria sintomática	30% (3/10)
Thanos (2010)	1	Auto	100% (1/1)	Superfície ocular estável	100% (1/1)
Tsai (2000)	6	Auto	100% (6/6)	Superfície ocular estável	50% (3/6)

AV - acuidade visual; CSA - ciclosporina A; FACO + LIOCP - facoemulsificação do cristalino com implante de lente intraocular; KLAL - alotransplante querato-límbico; MA - recobrimento com membrana amniótica; PTK - queratectomia fototerapêutica; QL - queratoplastia lamelar; QP - queratoplastia penetrante;

Tabela 4.1 Resultados do transplante de células estaminais límbicas expandidas ex vivo

Complicações	Procedimentos simultâneos	Procedimentos posteriores	Seguimento (meses)
-	-	QP (3)	17.5 [12-17]
Persistência de fibrina (12) Hemorragia sob o enxerto (12) Problemas com transporte (14)	-	Novo enxerto (11) QP / QL / PTK (46)	34.9 [12-113]
Invasão conjuntival (1)	-	-	12 [-]
Rejeição QP (3) Falência QP (1) Glaucoma (1)	-	QP (15)	15.3 [7-24]
Rejeição (1)	-	-	29.5 [25-34]
Queratite infecciosa (2) Glaucoma terminal (2) Phthisis bulbi (2)	-	QP (19)	18.3 [3-40]
Falência expansão ex vivo (1)	-	Novo enxerto (1)	10.5 [2-24]
Queratite infecciosa (1) Granuloma (1) Desprendimento do enxerto (1) Efeitos secundários CSA (2)	QP / QL (5)	Novo enxerto (1) QP (1)	13 [6-19]
Perfuração (4) Queratite infecciosa (2) Simbléfaro (3) Glaucoma (1)	-	Novo enxerto (1) QP (3)	Não referido
Falência primária (10) Úlcera (4) Queratite infecciosa (3) Perfuração (4)	-	QP (8) KLAL (3)	31.8 (7-92)
Queratite infecciosa (1) Desprendimento do enxerto (1) Efeitos secundários CSA (1) Falência primária (1)	-	Novo enxerto (1)	9.2 [6 - 13]
Simbléfaro Neovascularização	-	Bevacizumab sc (1)	28 [-]
-	-	-	15 [-18]

Tabela 4.1. (continuação)

Estudo	Nº olhos	% sucesso	Crêterios de sucesso	Melhoria AV
Ang (2006)	10	100% (10/10)	Superfície ocular estável	30% (3/10)
Inatomi (2006a)	15	67% (10/15)	Superfície ocular estável	27% (4/15)
Inatomi (2006b)	2	100% (2/2)	Superfície ocular estável	100% (2/2)
Nakamura (2004b)	6	100% (6/6)	Superfície ocular estável	33% (2/6)
Nishida (2004)	4	100% (4/4)	Superfície ocular estável	75% (3/4)

AV - acuidade visual; FACO + LIOCP - facoemulsifica o do cristalino com implante de lente intraocular; MA - recobrimento com membrana amniótica; QP - queratoplastia penetrante;

Tabela 4.2. Resultados do transplante de células da mucosa oral expandidas *ex vivo*

Dos 559 olhos submetidos a transplante de células estaminais límbicas expandidas *ex vivo*, apenas foi possível apurar o resultado final em 549. O sucesso global deste procedimento foi de 76,5% (420/549). No grupo dos autotransplantes, este valor foi de 78% (366/468) e no dos alotransplantes de 67% (54/81). A superioridade dos autoenxertos em rela o aos aloenxertos   estatisticamente significativa ($p=0,02$, *odds ratio* 1,79). Dos 29 olhos em que foram transplantados enxertos obtidos a partir de células da mucosa oral autóloga, a percentagem de sucesso foi de 83% (24/29).

A influência da técnica utilizada no sucesso clínico foi avaliada (tabela 5). Para tal, procedeu-se   compara o dos resultados de acordo com vários parâmetros, como a utiliza o de explante ou suspensão celular, o uso de fibroblastos 3T3, membrana amniótica (intacta ou desepitelizada) e *airlifting* (teste de Chi-quadrado).

Complicações	Procedimentos simultâneos	Procedimentos posteriores	Seguimento (meses)
Queratite infecciosa (1) Defeito epitelial (4)	-	FACO + LIOCP (6) MA (6)	11.6 [8-19]
Defeito epitelial persistente (5) Neovascularização periférica (15)	FACO + LIOCP (6) QP (2) VPPP (1) Correcção de entrópion (2)	Novo enxerto (2)	20 [3-34]
Defeito epitelial (1) Hipertensão ocular (1)	-	QP + FACO + LIOCP (2)	22.5 [19-26]
Defeito epitelial (1) Neovascularização periférica (6)			13.8 [11-17]
-	-	-	14 [13-15]

Tabela 4.2. (continuação)

Para esta análise, foram considerados apenas os casos de transplante autólogo de células límbicas, para que o sucesso não seja afectado pela probabilidade de rejeição. Dessa forma, foram excluídas as séries de Daya 2005, Koizumi 2001a, Sangwan 2005a, bem como os aloenxertos das séries de Nakamura 2006 (7 casos), Pauklin 2010 (14 casos), Sangwan 2005b (1 caso) e Schwab 2000 (4 casos). A série de Shimazaki 2007 foi também excluída pela impossibilidade de se saber quais os auto e aloenxertos que se obtiveram através de cada um dos métodos de cultura utilizados.

Verificou-se a ausência de correlação estatística entre os vários parâmetros testados e o sucesso clínico.

	Sucesso	Falência	TOTAL	<i>p</i>
Explante vs suspensão (n=461)				
Explante	108	29	137	0,8
Suspensão	252	72	324	
Com 3T3 vs sem 3T3 (n=461)				
Com 3T3	252	70	322	0,89
Sem 3T3	108	31	139	
Dos que usam 3T3, comparação com vs sem membrana amniótica (n=322)				
3T3 sem membrana amniótica	243	65	308	0,2
3T3 com membrana amniótica	9	5	14	
Com membrana amniótica vs sem membrana amniótica (n=461)				
Com membrana amniótica	115	36	151	0,48
Sem membrana amniótica	245	65	310	
Membrana amniótica com vs sem células epiteliais (n=148)				
MA com células epiteliais	38	7	45	0,16
MA sem células epiteliais	76	27	103	
(excluído Shortt 2008 porque usa membrana amniótica parcialmente desepitelizada)				
Com <i>airlifting</i> vs sem <i>airlifting</i> (n=461)				
Sem <i>airlifting</i>	351	97	448	0,43
Com <i>airlifting</i>	9	4	13	

Tabela 5. Análise de resultados em função de vários parâmetros da técnica

O impacto da etiologia no sucesso final foi avaliado e para tal foram analisados os 362 olhos em que foi possível saber o resultado individual (tabela 6). Foram excluídos desta análise os casos de etiologia desconhecida. Verificou-se que os traumatismos químicos e térmicos estão associados a um melhor resultado ($p=0,02$; *odds ratio* 1,9) e que o síndrome de Stevens-Johnson condiciona negativamente o prognóstico ($p=0,001$; *odds ratio* 3,5). As restantes etiologias não afectam o resultado.

Transplante de células limbicas	Total	Auto			Alo		
		nº	nº	Sucesso	%	nº	Sucesso
Traumatismo químico ou térmico	418 ^a	252	197	78%	23	17	74%
Pterigium e pseudo-pterigium	30 ^b	20	16	80%	1	1	100%
Síndrome de Stevens-Johnson	26	1	1	100%	25	12	48%
Iatrogénica	16 ^c	7	6	86%	-		
Inflamação crónica / Infecção	14 ^d	4	4	100%	2	2	100%
Aniridia / Anomalia Rieger (Pax6 haploinsuficiência)	11	-			11	7	64%
Penfigóide e pseudo-penfigóide cicatricial ocular	8 ^e	-			7	5	71%
Displasia ectodérmica	4	-			4	2	50%
Doença do enxerto contra hospedeiro	2	-			2	2	100%
Distrofia de córnea	1	-			1	1	100%
Úlcera neurotrófica	1	1	1	100%	-		
Epidermólise bolhosa	1	1	1	100%	-		
Perfuração ocular	1 ^f				-		
Desconhecido	26						
Total	559	286	226	79%	76	49	64%

^a excluídos 143 olhos por se desconhecer resultado (Sangwan 2006, Di Iorio 2010)

^b excluídos 9 olhos por se desconhecer resultado (Pauklin 2010)

^c excluídos 9 olhos por se desconhecer resultado (Di Iorio 2010, Pauklin 2010)

^d excluídos 8 olhos por se desconhecer resultado (Di Iorio 2010, Pauklin 2010)

^e excluído 1 olho por se desconhecer resultado (Shimazaki 2007)

^f excluído 1 olho por se desconhecer resultado (Pauklin 2010)

Tabela 6. Taxa de sucesso por etiologia

E2. Sintomatologia

Onze séries fornecem informações sobre a melhoria sintomática (Pellegrini 1997, Rama 2001, Daya 2005, Sangwan 2005b, Sangwan 2006, Fatima 2007, Shortt 2008, Di Girolamo 2009, Kolli 2010, Gisoldi 2010, Rama 2010). Em todas elas, o alívio dos sintomas

foi coincidente com a melhoria dos sinais clínicos de insuficiência límbica. Apenas em dois estudos foi avaliada através de sistema de pontuação (Di Girolamo 2009, Kolli 2010).

E3. Acuidade visual

É difícil uma avaliação rigorosa dos resultados visuais. Há diferenças nas escalas utilizadas, assim como nos critérios de melhoria da acuidade visual (AV). Além disso, nem sempre os detalhes de cada doente são individualizados, mas antes os resultados são fornecidos em grupo, como médias ou resultados globais o que impossibilita uma análise minuciosa. Apesar disso, e mesmo tendo em conta que a performance visual é um objectivo secundário nestes doentes, julgamos adequado analisar o impacto deste tratamento na visão. Para isso, estabelecemos como critério de melhoria significativa um aumento de duas ou mais linhas de Snellen ou, nos casos de AV <1/10 pré-operatória, uma AV final \geq 1/10. Este último critério justifica-se pela dificuldade de traduzir acuidades visuais de “conta dedos” ou “movimento de mãos” por um valor numa escala, e pela noção de que uma acuidade visual de 1/10 é considerada visão útil.

Analisando as várias séries publicadas, constata-se uma melhoria significativa da acuidade visual em 56% dos doentes (230/412): 57% (220/383) no grupo tratado com células límbicas e 34% (10/29) no grupo tratado com células provenientes da mucosa oral.

No entanto, convém ter presente que a melhoria da visão não é um bom indicador de sucesso. Pode não haver melhoria da acuidade visual por ser boa *ab initio*, como nos casos de insuficiência parcial. Pelo contrário, nos casos com opacificação estromal, a AV pode permanecer baixa, apesar do sucesso na reconstrução da superfície corneana e da resolução da sintomatologia.

Para avaliar a influência da realização de queratoplastia na melhoria da acuidade visual, procedemos à análise de 231 olhos em que ambos os parâmetros (realização de queratoplastia e melhoria da AV) estavam discriminados, de entre as séries publicadas (tabela 7). Através da aplicação do teste de Chi-quadrado a estas duas variáveis

quantitativas, pudémos concluir que a melhoria da AV está estatisticamente relacionada com a realização de queratoplastia ($p < 0.001$). O *odds ratio* (OR) obtido foi de 2,8, o que significa que a melhoria da AV foi 2,8 vezes superior no grupo dos olhos submetidos a queratoplastia.

		Melhoria AV		<i>p</i> (<i>Odds ratio</i>)
		Não	Sim	
Queratoplastia	Não	72	70	< 0,001 (2,8)
	Sim	24	65	

Tabela 7. AV vs queratoplastia

E4. Procedimentos cirúrgicos simultâneos e subsequentes

Verifica-se que, com alguma frequência, o transplante de células foi associado a outros procedimentos cirúrgicos simultâneos ou subsequentes (tabelas 4.1, 4.2 e 8). O mais frequente foi a queratoplastia penetrante ou lamelar ($n=157$), representando cerca de 65% das cirurgias adicionais. Foi realizada no mesmo tempo operatório em 16 olhos ou posteriormente em 141 olhos, após um período variável entre 2 e 34 meses (Daya 2005, Kawashima 2007). No entanto, a maioria dos autores recomenda um intervalo mínimo de 6 meses entre as duas cirurgias.

Com menos frequência, os doentes foram submetidos a cirurgia de catarata, a injeção subconjuntival de anti-VEGF, KLAL/CLAL, a desbridamento epitelial mecânico, entre outros (tabela 8). Em 17 casos, houve necessidade de repetir o enxerto celular. Alguns olhos foram submetidos a mais do que um procedimento adicional.

Procedimentos adicionais	Limbo		Mucosa Oral		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%
Queratoplastia penetrante / lamelar / PTK	155 *	71,4%	2	8,0%	157	64,9%
Repetição do enxerto celular	15	6,9%	2	8,0%	17	7,0%
Cirurgia de catarata	14	6,5%	12	48,0%	26	10,7%
Injecção de anti-VEGF subconjuntival	12	5,5%			12	5,0%
KLAL / CLAL-Ir / enxerto corneoescleral	11	5,1%			11	4,5%
Recobrimento com membrana amniótica	6	2,8%	6	24,0%	12	5,0%
Epiteliectomia sectorial + MA	3	1,4%			3	1,2%
Outros	1	0,5%	3	12,0%	4	1,7%
Total	217	100%	25	100%	242	100%

* inclui 1 caso de PTK (queratectomia fototerapêutica)

CLAL-Ir - autotransplante de conjuntiva e limbo de dador relacionado; MA - membrana amniótica; VEGF - vascular endothelial growth factor;

Nota: o recobrimento com membrana amniótica aquando do transplante de células não foi considerado como cirurgia adicional

Tabela 8. Procedimentos adicionais

E5. Complicações

Do universo dos 549 olhos tratados com enxerto de células límbicas expandidas ex vivo, registou-se um total de 112 complicações (tabelas 4.1, 4.2 e 9). As mais frequentes foram as relacionadas com o transporte do enxerto até à sala operatória e com a adesão do enxerto ao leito receptor no período pós-operatório precoce, dificultada pela persistência de fibrina ou pela existência de sangue sob o enxerto/membrana amniótica. Em dois casos, houve desprendimento do enxerto, que levou à repetição do procedimento.

Registaram-se episódios de rejeição e/ou falência do enxerto em 35 casos, o que representa 31,3% do total de complicações e 6,4% do total de olhos tratados. Dos 11 casos de falência primária, um foi submetido a novo enxerto celular (Shortt 2008); desconhecemos a abordagem efectuada aos restantes 10 (Shimazaki 2007). Verificou-se invasão conjuntival localizada em 15 olhos, dos quais em 3 foi realizado desbridamento epitelial mecânico (Kolli

2008) e em 5 realizado KLAL sectorial (Daya 2005). Os 5 casos que manifestaram episódios de rejeição aguda apresentaram resolução do quadro com tratamento médico.

Complicações	n°	%
Transporte e complicações mecânicas	41	36,6%
Problemas com transporte	14	
Hemorragia sob o enxerto	13	
Persistência da fibrina > 48h	12	
Desprendimento do enxerto	2	
Falência / rejeição do enxerto	35	31,3%
Falência primária do enxerto	11	
Invasão conjuntival localizada	15	
Rejeição aguda do enxerto celular	5	
Defeito epitelial persistente	4	
Queratite infecciosa	11	9,8%
Rejeição de enxerto de córnea	7	6,3%
Perfuração	7	6,3%
Hipertensão ocular / Glaucoma	4	3,6%
Efeitos secundários da ciclosporina A	3	2,7%
Outras	4	3,6%
Total	112	100%

Tabela 9. Complicações após transplante de células límbicas expandidas ex vivo

Verificaram-se 11 casos de queratite infecciosa (2,0% do total de olhos tratados), na sua maioria em receptores de aloenxertos (7 alotransplantes, 2 autotransplantes, em 2 informação não fornecida).

De entre os olhos tratados com enxertos provenientes de mucosa oral, a complicação mais frequentemente encontrada foi a neovascularização periférica, que atingiu 51,7% do total de olhos tratados (n=15). Outras complicações menos frequentes foram os defeitos epiteliais persistentes (n=9) e a queratite infecciosa (n=1).

E6. Evidências do sucesso terapêutico e da persistência de células dadoras

O sucesso terapêutico da expansão *ex vivo* de células estaminais límbicas é demonstrado pelas evidências de melhoria clínica ao longo de vários anos de seguimento, corroboradas, em alguns casos, pelos achados na citologia de impressão e pela histologia do botão corneano excisado aquando da realização de queratoplastia.

A avaliação pré e pós-operatória por citologia de impressão foi realizada em quatro séries (Rama 2001, Shortt 2008, Baradaran-Rafii 2010, Kolli 2010), das quais apenas uma se limitou à detecção de células caliciformes por microscopia óptica (Baradaran-Rafii 2010). As restantes três séries fizeram a caracterização fenotípica através da detecção de marcadores celulares (Ck3 e Ck19) e todas demonstraram o restauro do fenótipo corneano após o enxerto (Rama 2001, Shortt 2008, Kolli 2010).

Em nove séries, o botão corneano excisado durante a queratoplastia foi submetido a avaliação histológica, comprovando a existência de um epitélio estratificado não queratinizado, sem células caliciformes. Em algumas delas, a imunohistoquímica revelou semelhanças com o epitélio normal da córnea (Pellegrini 1997, Sangwan 2005a, Fatima 2007, Kawashima 2007, Gisoldi 2010, Kolli 2010, Rama 2010) e noutras com o do limbo (Grueterich 2002c, Daya 2005).

No entanto, estas evidências apenas demonstram que esta técnica pode restaurar o epitélio corneano, mas não prova que o epitélio provem das células transplantadas. Até à data, apenas um estudo procurou avaliar a persistência das células dadoras no receptor (Daya 2005). Fê-lo com base na detecção de ADN do dador através de técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase). Apesar de ter demonstrado, através de exame

histológico e imunohistoquímico, que se forma um epitélio semelhante ao límbico, o ADN do dador não foi detectado depois de decorridos 9 meses do transplante, nem em amostras de citologia de impressão (n=7), nem em córneas removidas aquando de queratoplastia (n=3).

A constatação de que as células dadoras não sobrevivem apesar do aparente sucesso tem implicações terapêuticas, na medida em que dispensa um esquema imunossupressor prolongado. Por outro lado, faz questionar o seu mecanismo de acção. Sabe-se, aliás, que este fenómeno ocorre nos enxertos cutâneos, sugerindo que as células transplantadas libertem factores de crescimento e citocinas necessárias à reparação celular (Schwab 2000). Outras teorias têm sido sugeridas, como o seu eventual efeito quimiotáctico para células provenientes de locais distantes (Daya 2005).

III. ENQUADRAMENTO LEGAL, INSTALAÇÕES E RECURSOS HUMANOS

A expansão celular *ex vivo* é regulamentada pela Lei nº 12/2009, que transpõe para a legislação portuguesa as Directivas Comunitárias nº 2004/23/CE de 31 de Março e 2006/86/CE de 24 de Outubro, estabelecendo o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana.

Segundo esta lei, sempre que tecidos e células sejam expostos ao meio ambiente durante o processamento, sem um processo subsequente de inactivação microbiana, é necessária uma qualidade do ar com contagem de partículas e de colónias microbianas equivalentes às de grau A, como definido no Anexo I do Guia Europeu de Boas Práticas de Fabrico (tabelas 10 e 11).

Neste sentido, é necessário que o processamento das células e tecidos seja realizado em área de ambiente A, isto é, no interior de câmara de fluxo laminar, localizada em sala com ambiente grau B.

Para garantir a qualidade do ambiente pretendida, devem ser adoptados procedimentos de limpeza adequados e evitar a contaminação a partir do exterior, através do uso de filtros no sistema de ventilação, do estabelecimento de gradientes de pressão e da utilização de vestuário apropriado.

Tamanho	INACTIVO		EM UTILIZAÇÃO	
	≥0.5 µm	≥5 µm	≥0.5 µm	≥5 µm
Grau A	3500	1	3500	1
Grau B	3500	1	350000	2000
Grau C	350000	2000	3500000	20000
Grau D	3500000	20000	Não definido	Não definido

Tabela 10. Nº de partículas/m² máximo permitido

	Amostra de ar	Placas de sedimentação (90 mm Ø)	Placas de contacto (55 mm Ø)	Impressão dos 5 dedos de luva
Unidade	CFU/ m ³	CFU/ 4 horas	CFU/ placa	CFU/ luva
Grau A	< 1	<1	<1	<1
Grau B	10	5	5	5
Grau C	100	50	25	-
Grau D	200	100	50	-

CFU - Colony forming unit

Tabela 11. Limites recomendados de contaminação microbiana

A ventilação das instalações deve ser adequada ao tamanho da sala e número de utilizadores. O sistema de ventilação deve estar equipado com filtros terminais apropriados, idealmente filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Air*).

Salas contíguas de diferentes graus devem ter diferenças de pressão na ordem dos 10-15 Pa, por forma a que exista um gradiente de pressão positiva que impeça a contaminação das áreas A/B. Pelo mesmo motivo, a entrada nas salas deve ser feita através de portas estanques, impedidas de abrir em simultâneo. Devem existir sensores de pressão nas várias salas, e os diferenciais de pressão monitorizados ou registados regularmente.

O vestuário deve ser apropriado ao tipo de ambiente. Em salas de grau A/B, deve ser usado touca, máscara facial, luvas estéreis de borracha sem pó, calçado esterilizado ou desinfectado e roupa adequada, que não liberte fibras nem partículas (*lint-free*) e que retenha partículas libertadas pelo corpo.

Deve existir um registo de todas as actividades que decorrem no interior do laboratório, desde os protocolos laboratoriais, à forma como se deve efectuar a limpeza das instalações e à eliminação de resíduos, por exemplo. Para cada actividade, os materiais, equipamento e pessoal envolvidos são identificados e documentados e todos os passos têm de estar enumerados tipo *checklist*.

Estas Unidades são objecto de auditorias no mínimo de 2 em 2 anos.

Recursos humanos

Segundo a Lei 12/2009, o responsável por uma unidade de manipulação de tecidos e células deve ser médico ou licenciado em Ciências Farmacêuticas ou Biológicas e possuir experiência de pelo menos dois anos na área (artº 14º). O pessoal afecto a estas unidades deve possuir as qualificações adequadas ao desempenho das suas funções e receber formação adequada, atempada e regular (artº 15º), competindo à ASST (Autoridade dos Serviços de Sangue e Transplantação) estabelecer as directrizes referentes à formação e qualificação dos profissionais envolvidos (artº 6º).

CONCLUSÃO

Vários estudos clínicos publicados demonstram a eficácia do transplante de células estaminais límbicas expandidas *ex vivo* no tratamento da insuficiência límbica a curto e médio-prazo. Os autotransplantes têm maior eficácia que os alotransplantes. A percentagem de sucesso nas situações em que é possível realizar transplante autólogo é elevada, rondando os 80%.

A etiologia da insuficiência límbica influencia o sucesso, tendo sido demonstrado que os traumatismos químicos ou térmicos têm melhor prognóstico e que o síndrome de Stevens-Johnson está associado a piores resultados.

Não existe um protocolo de expansão “ótimo”. Perante a tendência para a exclusão de produtos de origem animal durante a cultura, julgamos adequado desenvolver uma técnica baseada na utilização de soro autólogo sobre um suporte de membrana amniótica intacta, pois as células epiteliais da membrana amniótica são fundamentais para a manutenção do fenótipo indiferenciado das células estaminais em cultura, na ausência de fibroblastos.

Apesar da eficácia demonstrada, falta ainda esclarecer o mecanismo de acção desta técnica, uma vez que foi provado que as células dadoras não persistem a longo-prazo.

Por último, resta salientar que a legislação vigente é extremamente exigente, o que torna o procedimento dispendioso e só exequível em alguns centros. Desta forma, a tendência é a centralização do processo, pelo que será necessário, num futuro próximo, desenvolver técnicas de armazenamento adequadas ao transporte destas culturas celulares para outras instituições.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Joaquim Neto Murta, pelas oportunidades de aprendizagem que lhe concedeu e que complementaram este trabalho, e por todo o apoio dado enquanto Orientador.

À colega e amiga Dra Inês Marques, pelo apoio prestado na análise estatística.

À Dra Cristina Ramos, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U (2010) The culture and transplantation of human limbal stem cells. *J Cell Physiol* 225:15-19.

Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S (2006) Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 124:1543-1551.

Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S (2007) A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 143:178-180.

Ardjomand N, Berghold A, Reich ME (1998) Loss of corneal Langerhans cells during storage in organ culture medium, Optisol and McCarey-Kaufman medium. *Eye* 12:134-138.

Auböck J, Irschick E, Romani N, Kompatscher P, Höpfl R, Herold M, Schuler G, Bauer M, Huber C, Fritsch P (1988) Rejection, after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. *Transplantation* 45:730-737.

Baradaran-Rafii A, Ebrahimi M, Kanavi MR, Taghi-Abadi E, Aghdami N, Eslani M, Bakhtiari P, Einollahi B, Baharvand H, Javadi M-A (2010) Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty. *Cornea* 29:502-509.

Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Ponzin D, Di Iorio E (2009) Reconstruction of a human hemiacornea through natural scaffolds compatible with the growth of corneal epithelial stem cells and stromal keratocytes. *Molecular Vision* 15:2084-2093.

Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S (2011) 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of outcomes. *J Cell Biochem* 112:993-1002.

Chen B, Mi S, Wright B, Connon CJ (2010) Differentiation status of limbal epithelial cells cultured on intact and denuded amniotic membrane before and after air-lifting. *Tissue Eng Part A* 16:2721-2729.

Chen JJY and Tseng SCG (1990) Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1301-1314.

Chen JJY and Tseng SCG (1991) Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2219-2233.

Chen YT, Li W, Hayashida Y, He H, Chen S-Y, Tseng DY, Kheirkhah A, Tseng SCG (2007) Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells* 25:1995-2005.

Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzker FL, Pflugfelder SC, Li DQ (2004) Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 22:355-366.

Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker RM (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57:201-209.

Croasdale CR, Schwartz GS, Malling JV, Holland EJ (1999) Keratolimbal allograft: recommendations for tissue procurement and preparation by eye banks, and standard surgical technique. *Cornea* 18:52-58.

Davenger M and Evensen A (1971) Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229:560-561.

Daya SM, Watson A, Sharpe JR, Giledi O, Rowe A, Martin R, James E (2005) Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 112:470-477.

Di Girolamo N, Chui J, Wakefield D, Coroneo MT (2007) Cultured human ocular surface epithelium on therapeutic contact lenses. *Br J Ophthalmol* 91:459-464.

Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K, Coroneo MT, Wakefield D, Watson SL (2009) A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 87:1571-1578.

Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini P, De Luca M (2005) Isoforms of Δ Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9523-9528

Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Bohm E, Ponzin D, Barbaro V (2010) Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. *Ocul Surf* 8:146-153.

Dua HS, Azuara-Blanco A (2000a) Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 44:415-425.

Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P (2000b) Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 48:83-92.

Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS (2004) The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 49:51-7.

Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A (2005) Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 89:529–532.

Dua HS, Miri A, Alomar T, Yeung AM, Said DG (2009) The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance. Testing the dogma. *Ophthalmology* 116:856-863.

Ebato B, Friend J, Thoft RA (1987) Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1450-1456.

Ebato B, Friend J, Thoft RA (1988) Comparison of Limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1533-1537.

Espana EM, Kawakita T, Romano A, Pascuale M, Smiddy R, Liu C-Y, Tseng SCG (2003) Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5130-5135.

Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC (2004) Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* 18:406-417.

Fatima A, Sangwan VS, Iftekhar G, Reddy P, Matalia H, Balasubramanian D, Vemuganti GK (2006) Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med* 52:257-261.

Fatima A, Vemuganti GK, Iftekhar G, Rao GN, Sangwan VS (2007) In vivo survival and stratification of cultured limbal epithelium. *Clin Exp Ophthalmol* 35:96-98.

Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK, Basti S, Sridhar MS, Bansal AK, Dua HS (2004) Limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol* 52:5-22.

Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN (2005) Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 24:643–653.

Francis D, Abberton K, Thompson E, Daniell M (2009) Myogel supports the ex vivo amplification of corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 88:339-346.

Galal A, Perez-Santonja JJ, Rodriguez-Prats JL, Abad M, Alió J (2007) Human anterior lens capsule as a biologic substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells in ocular surface reconstruction. *Cornea* 26:473-478.

Gisoldi RA, Pocobelli A, Villani CM, Amato D, Pellegrini G (2010) Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea* 29:715-722.

Gomes JAP, Romano A, Santos MS, Dua HS (2005) Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 16:233-240.

Gomes JAP, Pazos HSB, Silva ABE, Cristovam PC, Belfort Jr R (2009) Transplante de células-tronco epiteliais límbicas alógenas expandidas ex vivo sobre membrana amniótica: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* 72:254-256.

Gomes JAP, Monteiro BG, Melo GB, Smith RL, Silva MC, Lizier NF, Kerkis A, Cerruti H, Kerkis I (2010) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1408-1414.

Grueterich M and Tseng SC (2002a) Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol* 120:783-790.

Grueterich M, Espana E, Tseng SCG (2002b) Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:63-71

Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti S-E, Tseng SCG (2002c) Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 109:1547-1552.

Grueterich M, Espana E, Tseng SCG (2003a) Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelium expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4230-4236.

Grueterich M, Espana EM, Tseng SC (2003b) Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 48:631-646.

Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, Tano Y, Nishida K (2007) N-cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25:289-296.

Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J (2007) N-Glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202.

Holland EJ, DeRuyter DN, Doughman DJ (1987) Langerhans cells in organ-cultured corneas. *Arch Ophthalmol* 105:542-545.

Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, Kurokawa MS, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N (2004) Induction of epithelial progenitors *in vitro* from mouse embryonic stem

cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4320-4326.

Huang AJW and Tseng SCG (1991) Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:96-105.

Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S (2006a) Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141:267-275.

Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S (2006b) Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 142:757-764.

James SE, Rowe A, Ilari L, Daya S, Martin R (2001) The potential for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea* 20:488-494.

Kawashima M, Kawakita T, Satake Y, Higa K, Shimazaki J (2007) Phenotypic study after cultivated limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 125:1337-1344.

Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ (2004) Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res* 79:41-49.

Kobayashi A and Kazuhisa Sugiyama K (2005). In vivo corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea* 24:435-437.

Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ (2000) Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2506-2513.

Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S (2001a) Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108:1569-1574.

Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S (2001b) Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119:298-299.

Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S (2002) An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2114-2121.

Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F (2010) Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 28:597-610.

Kurpakus MA, Stock, EL, Jones JCR (1990) Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:448-456.

Li W, Hayashida Y, He H, Kuo C-L, Tseng SCG (2007) The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:605-613.

Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG (1993) In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:2672-2679.

Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L (2006) Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:315-321.

Madhira SL, Vemuganti G, Bhaduri A, Gaddipati S, Sangwan VS, Ghanekar Y (2008) Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 14:189-96.

Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y (2008) Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 456:250-254.

Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11:228-232.

Meller D, Fuchsluger T, Pauklin M, Steuhl K-P (2009) Ocular surface reconstruction in graft-versus-host disease with HLA-identical living-related allogenic cultivated limbal epithelium after haematopoietic stem cell transplantation from the same donor. *Cornea* 28:233-236.

Meyer-Blazejewska EA, Kruse FE, Bitterer K, Meyer C, Hofmann-Rummelt C, Wünsch PH, Schlötzer-Schrehardt (2010) Preservation of the limbal stem cell phenotype by appropriate culture techniques. *Invest ophthalmol Vis Sci* 51:765-774.

Mi S, Chen B, Wright B, Connon CJ (2010) Ex vivo construction of an artificial ocular surface by combination of corneal limbal epithelial cells and a compressed collagen scaffold containing keratocytes. *Tissue Eng Part A* 16:2091-2100.

Murakami D, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Takagi R, Yang J, Namiki H, Okano T (2006) Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. *J Artif Organs* 9:185-191.

Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S (2003) Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 22:70-71.

Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S (2004a) Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82:468-471.

Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S (2004b) Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88:1280-1284.

Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S (2006) Transplantation of cultivated autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 113:1765-1772.

Nakamura T, Inatomi T, Cooper LJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S (2007) Phenotypic investigation of human eyes with transplanted autologous cultivated oral mucosal epithelial sheets for severe ocular surface diseases. *Ophthalmology* 114:1080-1088.

Nguyen P and Yiu SC (2008) Ocular surface reconstruction: recent innovations, surgical candidate selection and postoperative management. *Expert Rev Ophthalmol* 3:567-584.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y (2004) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351:1187-1196.

Notara M, Bullett NA, Deshpande P, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT (2007a) Plasma polymer coated surfaces for serum-free culture of limbal epithelium for ocular surface disease. *J Mater Sci Mater Med* 18:329-338.

Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT (2007b) A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2:919-927.

Notara M, Alattza A, Gilfillan J, Harris AR, Levis HJ, Schrader S, Vernon A, Daniels JT (2010) In sickness and in health: corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Research* 90:188-195.

O'Sullivan F and Clynes M (2007) Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology* 53:101-106.

Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K (2009) The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2109-2115

Patel DV, Sherwin T, McGhee CNJ (2006) Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2823–2827.

Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, Steuhl K-P, Meller D (2010) Midterm results of cultivated autologous and allogenic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol* 45:57-70.

Pellegrini G, Traverso CE (1997) Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349:990-993.

Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M (1999) Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 145:769-782.

Pels E and van der Gaag R (1984) HLA-A, B, C and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 3:231-239.

Potten CS and Loeffler C (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020.

Raeder S, Utheim TP, Messelt E, Lyberg T (2010) The impact of de-epithelialization of the amniotic membrane matrix on morphology of cultured human limbal epithelial cells subject to eye bank storage. *Cornea* 29:439-445.

Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, Pellegrini G (2001) Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72:1478-1485.

Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G (2010) Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Eng J Med* 363:147-155.

Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P (1999) Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction. *Ophthalmology* 106:822-828.

Reza HM, Ng B-Y, Gimeno FL, Phan TT, Ang LP-K (2011) Umbilical cord lining stem cells as a novel and promising source for ocular surface regeneration. *Stem Cell Rev* DOI 10.1007/s12015-011-9245-7

Rheinwald JG and Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-344.

Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SCG (2003) Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5125–5129.

Rosa AM, Henriques J, Quadrado MJ, Murta JN (2008) Reconstrução da superfície ocular na insuficiência límbica - alotransplantes queratolímbicos. *Oftalmologia* 32:229-236.

Sangwan VS, Vemuganti GK, Iftexhar G, Bansal AK, Rao GN (2003) Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury. *Cornea* 22:478-481.

Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Iftexhar G, Fatima A, Singh S, Rao GN (2005a) Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol* 123:334-340.

Sangwan VS, Murthy SI, Vemuganti GK, Bansal AK, Gangopadhyay N, Rao GN (2005b) Cultivated corneal epithelial transplantation for severe ocular surface disease in vernal keratoconjunctivitis. *Cornea* 24:426-430.

Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Fatima A, Iftexhar G, Singh S, Nutheti R, Rao GN (2006) Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Ind J Ophthalmol* 54:29-34.

Schermer A, Galvin S, Sun T-T (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103:49-62.

Schlötzer-Schrehardt U and Kruse FE (2005) Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81:247–264.

Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L , Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE (2007) Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 85:845-860.

Schwab IR (1999) Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 97:891-986.

Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR (2000) Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 19:421-426.

Sharma A and Coles WH (1989) Kinetics of Corneal Epithelial Maintenance and Graft Loss. A Population Balance Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:1962-1971.

Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K (2002) Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109:1285-1290.

Shimazaki J, Higa K, Morito F, Dogru M, Kawakita T, Satake Y, Shimmura S, Tsubota K (2007) Factors influencing outcomes in cultivated limbal epithelial transplantation for chronic cicatricial ocular surface disorders. *Am J Ophthalmol* 143:945-953.

Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT (2007a) Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells* 25:1402-1409.

Shortt AJ, Secker JA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT (2007b) Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol* 52:483-502.

Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, Daniels JT (2008) Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 115:1989-1997.

Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT (2009) The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 30:1056-1065.

Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT (2010) Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective. *Ocul Surf* 8:80-90.

Sudesh S, Rapuano CJ, Cohen EJ, Eagle RC, Laibson PR (2000) Surgical management of ocular surface squamous neoplasms. The experience from a cornea center. *Cornea* 19:278-283.

Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G (2009) Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A* 75:54-66.

Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Ang L, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Kinoshita S (2006). Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3820-3827.

- Thanos M, Pauklin M, Steuhl K-P, Meller D (2010) Ocular surface reconstruction with cultivated limbal epithelium in a patient with unilateral stem cell deficiency caused by epidermolysis bullosa dystrophica hallopeau-siemens. *Cornea* 29:462-464.
- Thoft RA, Friend J (1983) The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance [letter]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1442-1443.
- Townsend WM (1991). The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 89:721-756.
- Tsai RJ, Li L, Chen J (2000) Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343:86-93.
- Varghese VM, Prasad T, Kumary TV (2010) Optimization of culture conditions for an efficient xeno-feeder free limbal cell culture system towards ocular surface regeneration. *Microsc Res Tech* 73:1045-1052.
- Waring GO 3rd, Roth AM, Ekins MB (1984) Clinical and pathologic description of 17 cases of corneal intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol* 97:547-559.
- Watt FM and Driskell RR (2010) The therapeutic potential of stem cells. *Phil Trans R Soc B* 365:155-163.
- Wolosin JM, Xiong X, Schütte M, Stegman Z, Tieng A (2000) Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog Retin Eye Res* 19:223-255.
- Yeung AM, Tint NL, Kulkarni BB, Mohammed I, Suleman H, Hopkinson A, Dua HS (2009) Infant limbus: an immunohistological study. *Exp Eye Res* 88:1161-1164.
- Yokoo S, Yamagami S, Usui T, Amano S, Araie M (2008) Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in a complete serum-free culture system without unknown factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2438-2443.
- Zakaria N, Koppen C, Tendeloo VV, Berneman Z, Hopkinson A, Tassignon M-J (2010) Standardized limbal epithelial stem cell graft generation and transplantation. *Tissue Eng Part C* 16:921-927.
- Zhang X, Sun H, Tang X, Ji J, Li X, Sun J, Ma Z, Yuan J, Han ZC (2005) Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 80:227-33.
- Zhang X, Sun H, Li X, Yuan X, Zhang L, Zhao S (2010) Utilization of human limbal mesenchymal cells as feeder layers for human limbal stem cells cultured on amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med* 4:38-44.