



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Expresión del factor de transcripción Sox9 durante la proliferación y diferenciación de la línea celular RCE1(5T5) de epitelio corneal de conejo”.

Tesis que presenta

Biól. Erick de Jesús Martínez Colín

para obtener el Grado de Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Biología Celular

Director de la Tesis:

Dr. José Federico Bernardo Castro Muñoz Ledo

Asesores:

Dr. Walid Kuri Harcuch
Dr. Enrique Othón Hernández

Ciudad de México

Julio 2020

Este trabajo fue realizado en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. José Federico Bernardo Castro Muñoz Ledo, y fue financiado en parte gracias al donativo 219601 y la beca de maestría **924940** otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

RESUMEN.

Hasta ahora, se ha descrito la participación de diferentes factores de transcripción en la proliferación y diferenciación del epitelio corneal. Entre éstos, Pax6 es señalado como regulador maestro del proceso de diferenciación. La evidencia reciente sugiere que el factor Sox9, regula la proliferación y la diferenciación en el epitelio corneal humano. Por ello se analizó, mediante RT-qPCR, la expresión de Sox9 durante la proliferación y diferenciación de las células RCE1(5T5) de epitelio corneal de conejo como modelo experimental. Los resultados se correlacionaron con la expresión de Pax6 y la citoqueratina K3, ambos ligados al programa de diferenciación, y con $\Delta Np63\alpha$ que se ha asociado a células troncales y/o progenitoras de origen epitelial, así como a la capacidad proliferativa y al programa de estratificación del tejido. Sox 9 presentó un patrón de expresión bifásico, con un máximo en la fase de crecimiento exponencial, y otro pico de expresión 2 días después de alcanzarse la confluencia. Los resultados fueron apoyados por el análisis de los transcriptomas de células RCE1(5T5) proliferativas, confluentes y diferenciadas. Por otra parte, al estudiar la distribución de Sox9 mediante ensayos de inmunofluorescencia, se encontró que éste se localiza en el núcleo de las células del borde proliferativo/migratorio de las colonias en crecimiento, así como en algunas células basales del epitelio estratificado. En contraste, en el resto de la población se localizó en el citoplasma. A futuro, los experimentos se deberán orientar a definir la participación de Sox9 tanto en la etapa proliferativa como en la diferenciación del epitelio corneal.

ABSTRACT.

So far, the involvement of different transcription factors in proliferation and differentiation of the corneal epithelium has been described. Among them, Pax6 is proposed as a master regulator of the differentiation process. Recent evidence suggests that Sox9 regulates proliferation and differentiation in the human corneal epithelium. Therefore, by RT-qPCR, Sox9 expression was analyzed during proliferation and differentiation of the rabbit corneal epithelial cell line RCE1(5T5) as an experimental model. The results were correlated with the expression of Pax6 and cytokeratin K3, both linked to the differentiation program, and with $\Delta Np63\alpha$ which has been associated with stem cells and/or progenitors of epithelial origin, as well as being proposed as a regulator of epithelial proliferative potential and tissue stratification. Sox 9 presented a biphasic expression pattern, with a maximum in the exponential growth phase, and another peak of expression 2 days after confluence. The results were supported by the analysis of transcriptomes from proliferative, confluent and differentiated RCE1(5T5) cells. On the other hand, by studying Sox9 distribution through immunofluorescence assays, we found that Sox9 is located in nuclei of cells at the proliferative/migratory edge of the growing colonies, as well as in the nucleus of some basal cells of the stratified epithelium. In contrast, in the rest of the cell population, it was located in the cytoplasm. In the future, experiments should be aimed at defining Sox9's participation in both the proliferative stage and the differentiation of the corneal epithelium.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mi familia, por el apoyo incondicional brindado para la realización y culminación de mis estudios de maestría.

A mi prometida Sandy, por amarme, por siempre apoyarme en mis proyectos, y por velar por mi bienestar y superación académica.

A mi director de Tesis; Dr. Federico Castro, por recibirme en su laboratorio, instruirme y tenerme la paciencia para que mi trabajo fuera satisfactorio y de calidad.

A los doctores, Walid Kuri y Enrique Othón por aceptar ser mis asesores, por sus valiosas clases y por los comentarios que enriquezcan este trabajo.

Al colegio de profesores del Departamento de Biología Celular, por darme la instrucción de excelencia en el campo y por demostrar que la ciencia mexicana es de calidad.

A mis amigos de maestría, por ser la mejor generación posible y sin los cuales no concibo poder haber terminado este grado y que me brindaron experiencias invaluable.

A la M. en C. Erika Sánchez Guzmán, por instruirme en las habilidades de laboratorio necesarias, por mantener a flote los experimentos y por su invaluable ayuda sin la cual este trabajo no hubiera podido ser terminado.

A José Juan Prado Barajas, por mantener siempre el laboratorio en condiciones óptimas y limpias, y por su colaboración con el material indispensable para este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Tere, Vere y Jorge. Por su apoyo en la realización de las técnicas, instrucción y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Finalmente agradezco al pueblo mexicano por la beca CONACyT, ya que con sus contribuciones al estado fue posible que cursara este posgrado.

INDICE

RESUMEN.	3
ABSTRACT.	4
AGRADECIMIENTOS.	5
INDICE	6
1. INTRODUCCIÓN.	8
1.1. ANATOMÍA DEL OJO Y LA CórNEA.	8
1.2. EL EPITELIO CORNEAL.	11
2. ANTECEDENTES.	16
2.1. PAX6 COMO REGULADOR DEL DESARROLLO CORNEAL.	16
2.2. EL GEN SOX9 Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA FUNCIONALIDAD DE LA CórNEA.	18
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	22
4. HIPÓTESIS.	24
5. OBJETIVOS.	25
4.1. OBJETIVO GENERAL.	25
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	26
5.1. MATERIALES.	26
5.2. CULTIVO DE CÉLULAS.	26
5.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.	27
5.4. SÍNTESIS DE cDNA.	27
5.5. RT-PCR CUANTITATIVA (RT-QPCR)	28
5.6. INMUNOTINCIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS RCE1(5T5).	30

5.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SOX9 EN EL TRANSCRIPTOMA DE 3 ETAPAS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.	31
5.8. MANEJO ESTADÍSTICO.	33
6. RESULTADOS.	34
6.1 CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE PAX6 Y SOX9.....	34
6.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE SOX9 RESPECTO A LA EXPRESIÓN DE LOS MRNA QUE CODIFICAN PARA LA CITOQUERATINA K3 Y PARA EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Δ NP63A.	37
6.3. INMUNOLocalización DE SOX9 EN CULTIVOS DE CÉLULAS RCE1(5T5) A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO.....	41
6.4. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE SOX9 Y OTROS GENES DE LA FAMILIA SOX. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE 3 FASES DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN.	44
7. DISCUSIÓN.....	47
8. CONCLUSIONES.	55
9. PERSPECTIVAS.	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Anatomía del ojo y la córnea.

El ojo es el sistema óptico complejo de los animales, especializado en la captación de luz, por lo que es el órgano principal de la visión (Fig. 1). Está constituido por una esfera llena de fluido rodeada por tres capas de tejido que cumplen funciones específicas. La capa más externa, conocida como Esclera o Esclerótica, constituye el 80% del área superficial del globo ocular, extendiéndose desde la córnea hasta la salida del nervio óptico, que está localizada en la porción posterior del órgano (Mannis & Holland, 2017). La Esclera está compuesta por tejido conectivo denso y forma lo que llamamos “el blanco del ojo”; ésta se continúa hacia la porción anterior con el estroma corneal, que es tejido conectivo transparente, especializado para permitir que los rayos de luz alcancen el interior del ojo. La función de la esclera, en conjunto con la presión intraocular, consiste en mantener la forma del globo ocular.

Aunque el suministro de nutrientes a la esclera depende de los vasos sanguíneos de la Episclera, que es una capa delgada de tejido conectivo laxo localizada sobre la Esclera y por debajo de la Conjuntiva que la recubre, la segunda capa, la Coroides, es una estructura pigmentada constituida por tejido conectivo y numerosos vasos sanguíneos. Su función es suministrar nutrientes a las partes internas del ojo, y formar parte de la úvea (Regatieri et al., 2014). Finalmente, la tercera capa –la retina- limita la pared interna del ojo y recibe la luz que el cristalino ha enfocado sobre ella para convertirla en señales neurales que son enviadas al cerebro para su procesamiento y codificación como una percepción visual (Schubert, 2014).

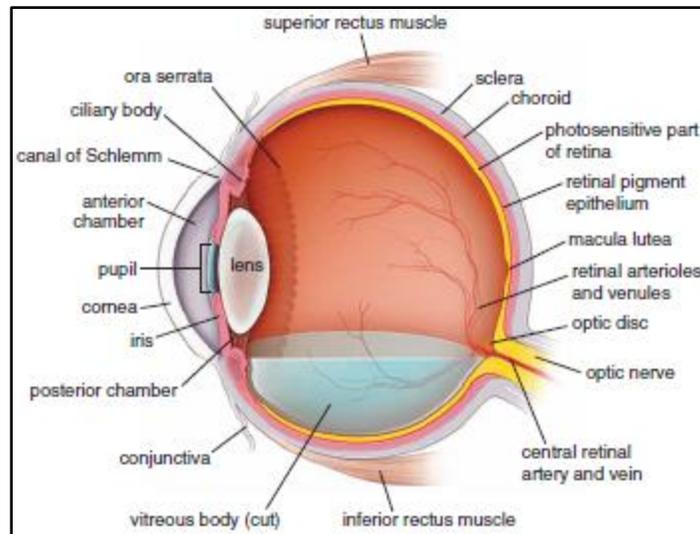


Figura 1. Esquema en corte transversal mostrando la anatomía interna del ojo (tomado de Ross & Pawlina, 2017).

La superficie ocular se encuentra expuesta a los efectos y agresiones de diversos agentes químicos y físicos, lo que la hace altamente susceptible a la desecación, a las lesiones y a agentes patógenos. Como consecuencia, existen numerosos mecanismos de protección para asegurar y mantener la capacidad visual del individuo. Para lograrlo, la evolución condujo al desarrollo del Sistema de Superficie Ocular, compuesto por: 1) el epitelio corneal, 2) el epitelio conjuntival, 3) las glándulas lacrimales y de Meibonio; 4) la película lacrimal, que recubre el ápice de los epitelios; 5) la matriz extracelular (Membrana o Capa de Bowman) localizada en la región basal de los mismos; 6) las pestañas y las glándulas de Moll y Zeiss asociadas a éstas; y finalmente, 7) los párpados y el ducto naso-lacrimal (Mannis & Holland, 2017; Gipson, 2007) (Fig. 1).

De los diferentes componentes del Sistema de Superficie Ocular; la córnea es la estructura más externa que protege al eje visual (Fig. 2a), esta se encuentra constituida por cinco capas, que desde el exterior hacia el interior son: el epitelio corneal, la membrana o capa de Bowman, el estroma corneal, la capa y el endotelio de Descemet (Fig. 2b).

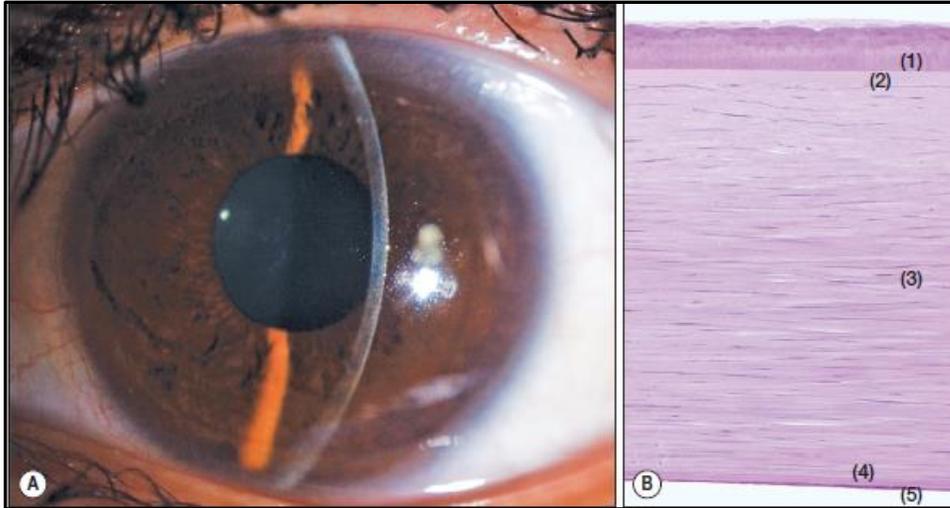


Figura 2. (a) Estructura macroscópica de la córnea normal observada con una lámpara de hendidura. (b) Estructura microscópica de la córnea donde se observa; (1) el epitelio, (2) la membrana de Bowmann, (3) estroma, (4) Membrana o capa de Descemet y (5) endotelio de Descemet. (Ross& Pawlina, 2017).

Durante la embriogénesis, la formación de la córnea comienza con el establecimiento de la vesícula óptica que subyace al ectodermo cefálico, al cual induce. Una vez que el ectodermo forma la placoda óptica, éste se invagina sobre la vesícula óptica para formar la copa óptica de la cual comenzarán a derivarse el epitelio del cristalino y el epitelio de la retina. Sin embargo el ectodermo cefálico seguirá su movimiento en epibolia para cerrar la abertura de la invaginación formando el epitelio presuntivo de la córnea. El estroma corneal se forma de los precursores mesenquimales que migran desde las crestas neurales y se establecen debajo de este epitelio presuntivo, contribuyendo a su maduración y estratificación (Swamynathan, 2013).

1.2. El Epitelio Corneal.

El epitelio corneal, de tipo no queratinizado, estratificado y escamoso, es contiguo al epitelio conjuntivo, aunque difiere en sus características. Consta de cinco a seis capas de células promedio en el humano y tiene un grosor aproximado de 50 μm . Consta de tres tipos de células epiteliales: células basales, que constituyen un solo estrato de células columnares adherido a la membrana basal o bien a la capa de Bowman; células aladas que presentan procesos con forma de alas y numerosas interdigitaciones. Y finalmente, las células superficiales, que pueden formar de dos y hasta cuatro capas. Estas últimas, poseen una forma poligonal con un grosor de 2-6 μm y un diámetro de 40-60 μm y en su superficie presentan microvellosidades. Embebidas en sus membranas se encuentran una gran cantidad de mucinas y glucolípidos que le confieren propiedades hidrofílicas (Mannis & Holland, 2017) (Fig.3).

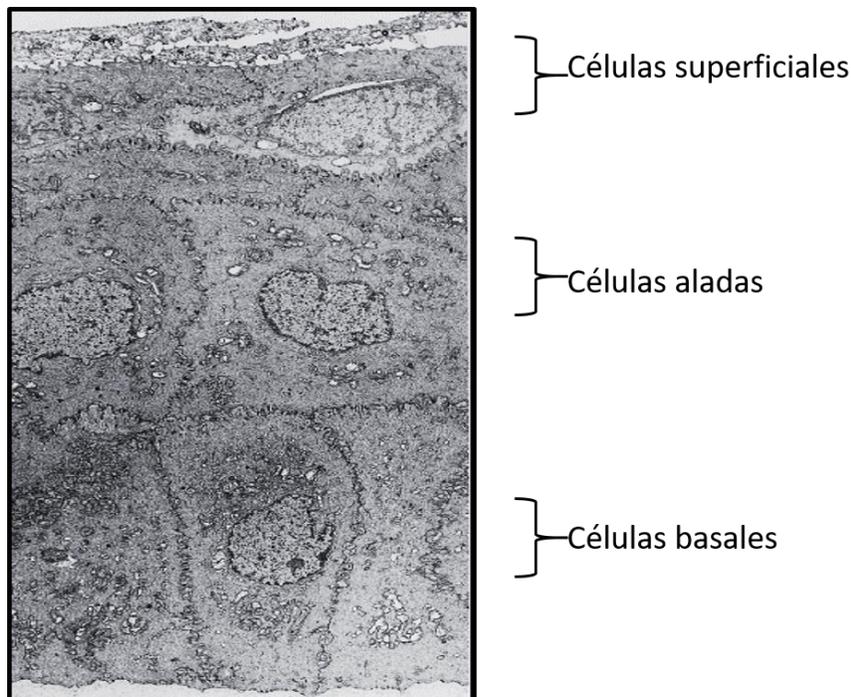


Figura. 3. Micrografía Electrónica de Barrido del epitelio corneal de humano. (Modificado de Suzuki K. *et al* 2003 por Mannis & Holland, 2017).

Ambos epitelios, el corneal y el conjuntival tienen la función de proteger la superficie anterior del ojo, objetivo que se cumple gracias a la función impermeable y selectiva de dichos epitelios. La estructura del epitelio corneal determina el establecimiento de interacciones célula-célula y célula-matriz que le permiten mantener su integridad y responder a procesos ambientales como las heridas. Estas características le permiten regenerar de manera ordenada dicha estructura, de tal manera que se mantiene la capacidad visual (Suzuki *et al.*, 2003). Partiendo desde la superficie corneal y moviéndose hacia el estroma, el primer tipo de unión intercelular que encontramos en este epitelio (y en general en los epitelios), es la unión estrecha, que se encuentra en el dominio apical de las células superficiales o del estrato más externo. Le siguen los desmosomas y las uniones adherentes, que se encuentran a lo largo de todos los estratos celulares del epitelio corneal, y de manera importante, las uniones comunicantes (Gap Junctions). Finalmente, en el dominio basal encontramos exclusivamente a los hemidesmosomas que median la adhesión del epitelio a la membrana basal (McLaughlin *et al.*, 1985), (Fig. 4).

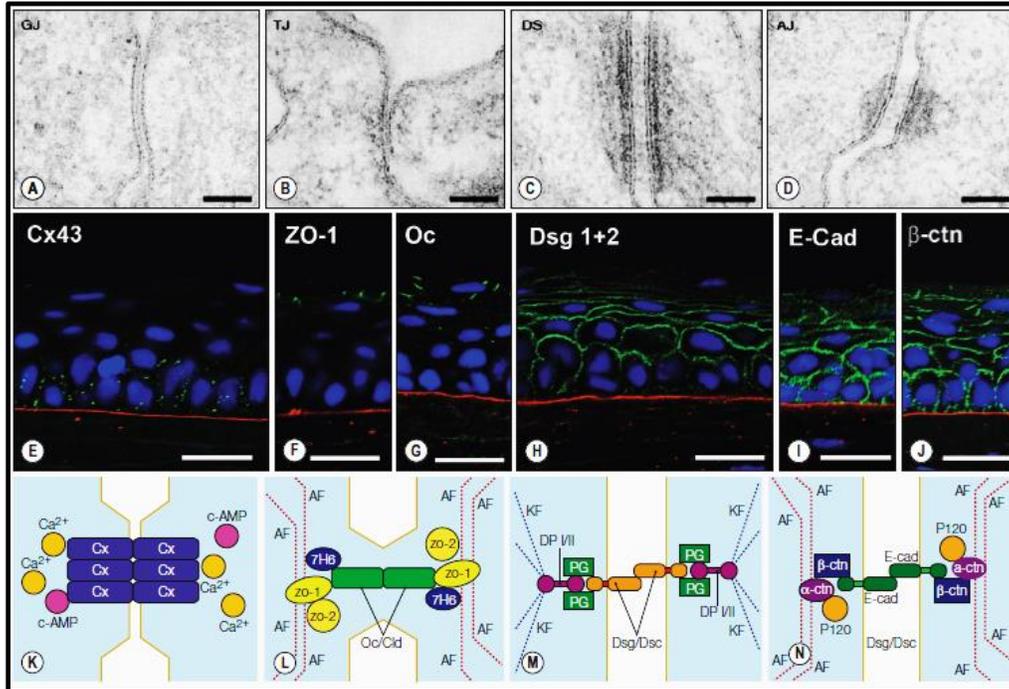


Figura. 4. Esquema que resume la estructura de las uniones celulares en el epitelio corneal. Cx43: conexina 43, ZO-1 :Zonula occludens-1, Oc:Ocludina, Dsg: Desmogelinas, E-cad: Cadherina epitelial, β -ctn: beta catenina.(Modificado de Suzuki K. et al 2003 por Mannis & Holland. 2017)

La diferenciación del epitelio corneal comienza con la expresión de marcadores moleculares específicos que promueven el inicio del programa de diferenciación. Como en la mayoría de los epitelios, este proceso parece simultáneo con la estratificación del epitelio, sin embargo, se demostró que el proceso de diferenciación no depende de la estratificación epitelial (Gómez-Flores et al., 2011). No obstante, existen marcadores que se asocian al proceso gradual de la diferenciación. Los epitelios se caracterizan por la expresión de filamentos intermedios específicos llamados citoqueratinas; que en el caso del epitelio corneal consiste en el par de queratinas; K3 (Schermer, A. *et al.*, 1986) y K12 (Moll, R. *et al.*, 1982). A su vez, al ser una capa protectora del ojo, el recambio y origen de las células del epitelio corneal requiere la existencia de un reservorio celular formado

por una población discreta y constante de progenitores que participa en la restauración y mantenimiento del linaje epitelial. Aunque históricamente se han postulado diferentes sitios anatómicos como lugares de residencia de las poblaciones de células troncales, como el estroma corneal o el endotelio (Amano *et al.* 2006). Sin embargo, la distribución de marcadores de diferenciación terminal y de células que atraviesan con baja frecuencia el ciclo celular (LRC, label retaining cells), ha llevado a proponer que éstas se encuentran en el sitio anatómico denominado como limbo corneal (revisado por Castro-Muñozledo, 2013).

EL limbo corneal es una zona epitelial de transición ubicada entre la conjuntiva y la córnea, caracterizada por presentar criptas o interdigitaciones con el estroma limbal. Sin embargo el limbo comprende no sólo al epitelio, sino incluye a la cápsula de tenón, a la lámina episcleral, a la región estromal subyacente que es contigua a la esclera, y por debajo, continuando hacia la cámara anterior del ojo donde también comprende al sistema de drenaje del humor acuoso constituido por el sistema trabecular y el canal de Schlemm (Hogan *et al.*, 1971). Con base en el análisis de la expresión de marcadores de diferenciación y del potencial proliferativo de los queratinocitos que lo componen, es factible postular al limbo como sitio putativo para la localización de las células troncales del epitelio (Schermer *et al.*, 1986; Kenyon & Tseng, 1989; Cotsarelis *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1994). La anterior aseveración es apoyada a su vez por la evidencia que proviene del estudio de las deficiencias o afectaciones de las poblaciones de células troncales del limbo corneal (Limbial Epithelial Stem Cells, LESC`s), que conllevan al desarrollo de patologías diversas, o bien, como ocurre en algunos síndromes hereditarios (Síndrome

de Stevens Johnson y la Queratopatía relacionada a la aniridia) alteran la formación y la dinámica del epitelio corneal (Secker & Daniels, 2008).

La regulación de las poblaciones de células troncales en el limbo corneal y su migración hacia la córnea central como respuesta a la renovación celular normal o a las lesiones, se resume en el modelo de migración centrípeta en “X-Y-Z” (Fig. 5) (Thoft & Friend, 1983).

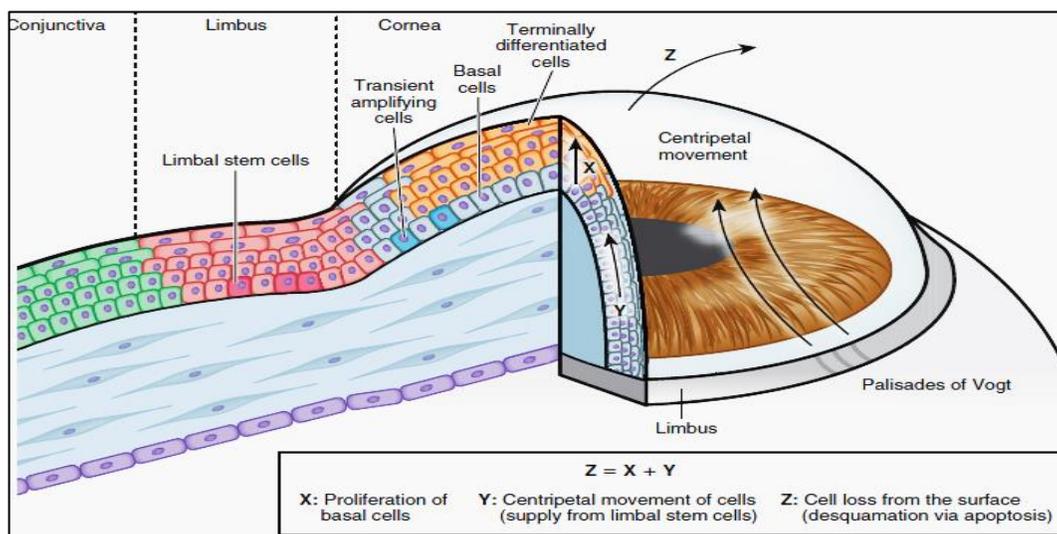


Figura 5. Esquema que ilustra el movimiento en X, Y y Z de las células del limbo corneal. (Mannis & Holland. 2017)

Este modelo postula que la ecuación $X+Y=Z$ resume la dinámica homeostática del epitelio corneal. En esta expresión “X” representa a la proliferación y diferenciación de las células basales, “Y” representa al movimiento centrípeta de las células epiteliales periféricas y “Z” representa la pérdida de células del epitelio. El movimiento centrípeta desde el limbo corneal hacia la córnea central está bien documentado (Davenger & Evensen, 1971; Buck, 1985), así como el recambio celular generado por acción tanto mecánica como apoptótica (Hanna et al. 1961; Estil et al., 2000).

2. ANTECEDENTES.

Durante la formación y maduración de las estructuras anatómicas, una gran cantidad de genes y moléculas de señalización interaccionan de manera regulada para dar lugar a un tejido u órgano con estructura y funcionalidad correcta/no patológica. En sentido amplio se puede categorizar a los genes que participan en dichos procesos en tres tipos diferentes: (i) Genes de efecto materno, los cuales suelen ser los primeros en expresarse siendo necesarios para el establecimiento del plano corporal básico, (ii) los genes de segmentación que ayudan a definir las capas blastodérmicas; y (iii) los genes homeóticos que participan en la formación correcta de estructuras anatómicas. Por lo tanto es prudente considerar que durante la formación de una estructura, participan varios genes cuya intervención ocurre de manera regulada (Carlson, 2014).

2.1. Pax6 como regulador del desarrollo corneal.

El desarrollo ocular está regulado por factores de transcripción “generales” que participan en la estructuración de todas las estructuras del ojo, incluyendo la córnea. Un factor de transcripción clave identificado como el regulador maestro de la morfogénesis del ojo, es *Pax6*, al cual se le adjudica la función de controlar el desarrollo de las estructuras oculares en la mayor parte de los metazoarios (Kozmik, 2005). *Pax6* es un factor de transcripción de 422 aminoácidos perteneciente al grupo IV de la familia de genes PAX (Fig 6). Posee dos dominios de interacción con el DNA, el primero es un dominio tipo *paired* o pareado localizado en el extremo N-terminal de la molécula y que consta de dos subdominios: un subdominio N-terminal o dominio PAI que comprende a los residuos 3 a 64, y un subdominio o dominio RED localizado hacia el centro de la

molécula y que incluye a los residuos 79 a 131. El segundo dominio, se extiende del residuo 209 al 270, y es del tipo caja homeótica o dominio HD. (Shaham *et al.* 2012). *Pax6* se expresa en todos los tejidos oculares donde participa promoviendo su inducción y diferenciación, tanto hacia linajes neuroectodérmicos como ectoepidermales (Shaham *et al.* 2012). En relación a la córnea, existe evidencia en humano, mono y gallo que sugiere que durante el desarrollo temprano del ojo, *Pax6* comienza su expresión en la córnea presuntiva (Koroma, *et al.* 1997; Nishina, *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2001).

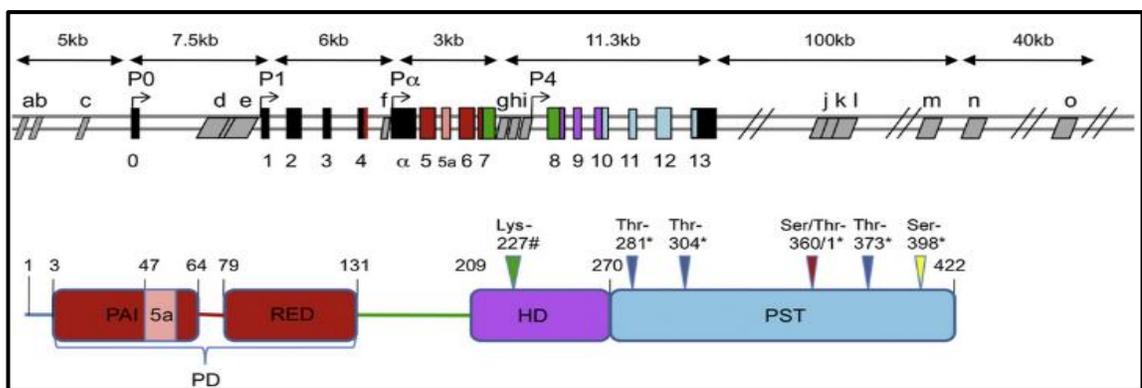


Figura 6. Estructura del gen y de la proteína de Pax6. PD: dominio pareado, PAI: subdominio N-terminal, RED: subdominio C-terminal, HD: Homeodominio, PST: Dominio transactivador rico en Prolina, Serina y Treonina. (Shaham *et al.* 2012).

Por otra parte, con base en la clonación y análisis de los genes que codifican a las citoqueratinas específicas del epitelio corneal (Wu *et al.*, 1994), se concluyó que la expresión de la citoqueratina K3 ligada al proceso de diferenciación terminal depende de los factores de transcripción AP2 y Sp1, que la regulan de manera dependiente de la estratificación, y posiblemente de manera específica de tejido (Chen *et al.*, 1997). Estudios posteriores demostraron que la regulación por Sp1 se puede hacer extensiva a la expresión de involucrina (Banks *et al.*, 1999; Adhikary *et al.*, 2005) y a las integrinas (Gingras *et al.*, 1993), sugiriendo que Sp1 controla la expresión genética tejido-específica en este epitelio (Nakamura *et al.*, 2005). Más recientemente, resultados de nuestro

laboratorio y de otros grupos, demostraron que el programa de diferenciación del epitelio corneal depende de Pax-6 (García-Villegas et al., 2009; Kitazawa et al., 2017), en un mecanismo que parece involucrar un efecto cooperativo entre sus isoformas Pax-6 canónica y Pax-6(5a), y algunos de los factores que confieren el carácter troncal a diferentes poblaciones celulares como es el caso de Oct-4 (Sasamoto et al., 2016).

La evidencia que apoya la actividad de *Pax6* como regulador maestro de la diferenciación corneal, se obtuvo utilizando a la línea celular inmortalizada de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5), que recapitula *in vitro*, el proceso de estratificación y diferenciación del epitelio corneal (Castro-Muñozledo, 1994). Con esta población celular, se demostró que *Pax6* es el marcador de expresión más temprano del proceso de diferenciación corneal (García-Villegas et al. 2009), antecediendo a otros marcadores bioquímicos como la enzima Lactato deshidrogenasa y el par de citoqueratinas K3/K12 (Hernández-Quintero et al. 2002). Experimentos realizados en modelos de pérdida de función de *Pax6* en ratón, demostraron que en condiciones normales la funcionalidad del gen, permite que las estructuras oculares (retina, córnea y cristalino) se formen por completo. No obstante, al disminuir gradualmente la funcionalidad de Pax6 conlleva a un fenotipo de desarrollo incompleto del ojo, donde entre las estructuras faltantes se encuentra la córnea (Favor, 2008).

2.2. El gen Sox9 y su posible participación en la funcionalidad de la córnea.

Considerando que existe un gran número de factores que participan en la regulación de los procesos de desarrollo y en la expresión específica de tejido, es

importante analizar y establecer si otros genes intervienen en la red regulatoria del proceso de diferenciación del epitelio corneal.

Un factor de transcripción que participa en gran cantidad de procesos de regulación de la expresión génica durante el desarrollo o la diferenciación es Sox9, que desempeña una función preponderante en la diferenciación sexual masculina o en la neurogénesis, entre otros procesos. A Sox9 se le conoce como el gen maestro regulador de la diferenciación condrogénica, aunque su función se ha descrito en varios órganos y sistemas (Pritchett, 2011).

Sox9 es un miembro de las proteínas del Grupo de Alta Movilidad (HMG), las cuales se caracterizan por su amplia gama de funciones en el núcleo, pues participan en la replicación, la transcripción y la reorganización de la cromatina. En su estructura proteica Sox9 posee un dominio de dimerización que le permite formar homo y heterodímeros, necesarios para su funcionalidad y activación. Asimismo posee tres dominios de transactivación que le confieren la capacidad de asociarse con diferentes proteínas y co-reguladores de la transcripción (Fig. 7). Se describió que se expresa en poblaciones de células troncales y de células progenitoras en tejidos derivados de las tres capas blastodérmicas (Jo *et al.*, 2014)

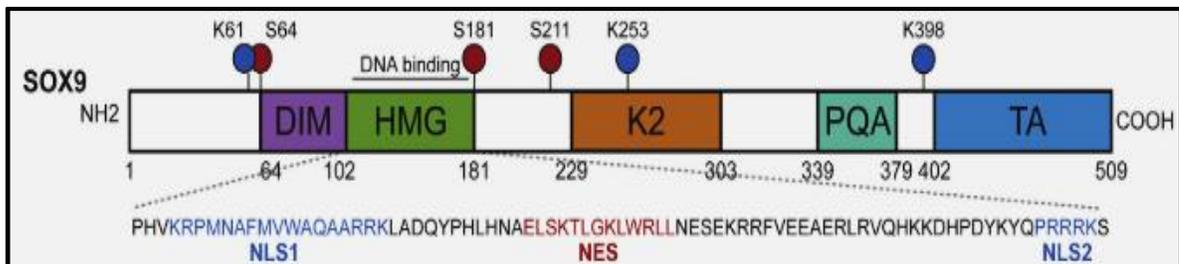


Figura 7. Estructura de la proteína de Sox9. DIM: dominio de dimerización, HMG: dominio de alta movilidad, K2:dominio transactivador central, PQA: dominio rico en prolina, glutamina y alanina, TA: dominio transactivador central. (Jo *et al.*, 2014).

Se reportó que *Sox9* también participa en la regulación de estructuras oculares, en particular en la retina, donde se ha asociado al control del ciclo visual o ciclo de fotorrecepción, donde interviene como transactivador de genes involucrados en el metabolismo de los pigmentos retinales (Masuda, 2014). También se describió su posible relación con *Pax6* durante el desarrollo de la vasculatura corioidal del epitelio pigmentario de la retina (RPE). En este caso la expresión de *Pax6* antecede e inhibe a *Sox9* durante la formación vascular (Cohen et al., 2018). Sin embargo, a tiempos tardíos *Sox9* participa en la etapa final del programa de diferenciación de la retina, existiendo una relación funcional y regulada entre los dos factores de transcripción (Cohen et al., 2018). Aunque *Sox9* interviene en la formación de la retina, la evidencia disponible sugiere que solo actúa como un regulador de la diferenciación de los linajes neurales y óptico-neurales a partir de los progenitores nerviosos y de la glía de Müller (Muto, 2009).

De manera particular, en células epiteliales se describió la funcionalidad de *Sox9* en la epidermis. En células troncales del folículo piloso (HFSC's), se observó que el knock-out condicional de *Sox9*, promueve la diferenciación de las células troncales del bulge hacia queratinocitos epidermales, en vez de participar nuevamente en el ciclo del folículo, lo que produce un abatimiento en la producción de estructuras pilosas (Kadaja et al., 2014). Asimismo, se sugiere que *Sox9* es un marcador de progenitores del epitelio luminal endometrial (Tempest et al., 2018), y participa en la diferenciación los progenitores epiteliales del árbol biliar, del páncreas y durante la regeneración del hígado (Furuyama et al., 2011). Así también se reporta su contribución en la metaplasia escamosa del epitelio esofágico (Clemons et al., 2012), y en la proliferación epitelial o en las alteraciones de ésta (Wang et al., 2019; Gonzalez et al., 2016).

Previamente se estudió la participación de Sox9 en la regulación de la diferenciación del epitelio corneal. Se le ha descrito como marcador potencial de células progenitoras o troncales, relacionando su expresión con la de otros marcadores de células troncales y con marcadores de poblaciones celulares que atraviesan el ciclo celular con muy baja frecuencia (“Label retaining or Slow cycling cells”) (Parfitt *et al.*, 2015; Sartaj *et al.*, 2017). Esta evidencia apoya la posibilidad de que Sox9 regule a los procesos de proliferación o diferenciación en el epitelio corneal, como ocurre en otros tejidos epiteliales y neurales.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Aunque la secuencia de eventos más aceptada propone que *Pax6* es el factor de transcripción que orquesta el proceso de diferenciación de las células epiteliales corneales, recientemente, el análisis comparativo de la expresión de genes entre células epiteliales del limbo y células epiteliales de la córnea central, permitió identificar un conjunto de genes pertenecientes al grupo *SoxE* cuya expresión en células basales del epitelio limbal era mayor que en el resto del epitelio (Menzel-Severing *et al.*, 2018). Estos autores describieron que *Sox9* co-localiza en el limbo con otros marcadores putativos de células troncales, incluyendo también a *Pax6*. De manera adicional, mediante experimentos de cierre de herida hallaron que este factor co-localizaba con el marcador de proliferación Ki67 en células limbales, lo que los hizo proponer que *Sox9* participa en la regulación de la proliferación (Menzel-Severing *et al.*, 2018). Más aún, mediante experimentos de inmunolocalización, estos autores encontraron que *Sox9* se encuentra preferentemente en el anillo proliferativo/migratorio de las colonias de células del epitelio limbal, y al avanzar el tiempo de cultivo, la señal se localiza también en células suprabasales (Menzel-Severing, *et al.*, 2018). Posteriormente, al noquear la expresión de *Sox9*, se observó que este factor de transcripción tiene una actividad regulatoria dual, ya que reprime la expresión de genes marcadores de células troncales como *ABCG2* y Δ Np63, y al mismo tiempo reprime genes asociados al fenotipo terminal como el par de citoqueratinas K3/K12, y la involucrina, que es un componente de la envoltura cornificada (Menzel-Severing *et al.*, 2018). También describieron que *Sox9* antagoniza la señalización de Wnt, ya que la activación de esta vía disminuye la expresión de *Sox9*. En contraste, la señalización mediada por la proteína morfogenética de hueso (BMP),

por Notch y por Sonic Hedgehog (SHH) regula de manera positiva a este factor (Menzel-Severing *et al.*, 2018).

Con base en estos resultados, se concluyó que Sox9 es el principal regulador del estado no diferenciado de las células basales del limbo, y que una disminución temporal en su expresión concuerda con el inicio del proceso de diferenciación. Estos resultados plantean la posibilidad de que Sox9 regule la expresión de Pax6, o bien, contravienen la posible actividad de Pax6 como factor maestro de la diferenciación del epitelio corneal. Teniendo en cuenta lo anterior, decidimos llevar a cabo un análisis que permita examinar a fondo la función biológica de Sox9. Para ello, en este trabajo evaluamos la cinética de expresión de Sox9 en cultivos de la línea celular de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5), previamente demostrada como un modelo que reproduce *in vitro* los eventos secuenciales que ocurren durante la diferenciación del epitelio corneal (Castro-Muñozledo, 1994). Al mismo tiempo, establecimos la relación temporal entre la expresión de Sox9 y Pax6 y comparamos ambos patrones de expresión con el cambio en marcadores de diferenciación como la citoqueratina K3. Finalmente, determinamos la localización celular y subcelular de Sox9 y evaluamos si se presentan cambios en su distribución durante la proliferación y diferenciación en cultivo.

4. HIPÓTESIS.

Sí Sox9 participa, ya sea en los procesos de proliferación o diferenciación de las células RCE1(5T5), entonces se espera que su temporalidad de expresión así como su localización subcelular cambien a lo largo de la recapitulación de los procesos biológicos antes mencionados durante el cultivo *in vitro*.

5. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General.

Establecer el patrón de expresión e inmunolocalización del factor de transcripción Sox9 durante la proliferación y la diferenciación, utilizando como modelo experimental a cultivos de la línea celular RCE1(5T5) de epitelio corneal de conejo.

4.2. Objetivos particulares.

- 4.2.1. Establecer mediante RT-qPCR el patrón de expresión de Sox9 durante el proceso de proliferación y diferenciación de las células RCE1(5T5).
- 4.2.2. Establecer mediante RT-qPCR el patrón de expresión de Pax6 y comparar la cinética de cambio con la expresión de Sox9.
- 4.2.3. Mediante la metodología antes mencionada, definir los patrones de expresión de $\Delta Np63\alpha$, un marcador de células proliferativas, y de la citoqueratina K3, ligada a la expresión del fenotipo terminal.
- 4.2.4. Mediante estudios de inmunotinción, establecer la localización de Sox9 en cultivos proliferativos y en epitelios diferenciados. Al mismo tiempo, determinar si su distribución es similar a la que muestra Pax6 en los mismos cultivos.
- 4.2.5. Verificar la expresión de Sox9 en los transcriptomas de células situadas en tres etapas diferentes del proceso de diferenciación: a) Proliferación, b) Confluencia, y c) Epitelios terminalmente diferenciados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Materiales.

El suero fetal de bovino, el suero de ternera, el TRIzol™ y la reverso transcriptasa SuperScript™ II, se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El Taq PCR Core Kit fue de Qiagen (Valencia, CA) y el Kit Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) fue de Fermentas, Inc (Waltham, MA, USA). Los oligonucleótidos para RT-qPCR fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos fue grado analítico.

5.2. Cultivo de células.

Las células RCE1(5T5) se sembraron a una densidad de 2.7×10^3 células/cm² (Castro-Muñozledo, 1994) en presencia de 2.2×10^4 células/cm² fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C como células alimentadoras (Rheinwald y Green, 1975, 1977). Los cultivos se suplementaron con DMEM/F12-Ham (3:1) conteniendo 5% (v/v) de FBS, 5 µg/ml de insulina, 0.4 µg/ml de hidrocortisona, 2×10^{-9} M de triiodotironina (L-T₃), 1×10^{-10} M de toxina del cólera, 24.3 mg/L de adenina y 10 ng/ml de EGF (Castro-Muñozledo, 1994). Los fibroblastos 3T3 (Todaro y Green, 1963) se cultivaron como ya se ha descrito (Castro-Muñozledo et al., 1997). Los cultivos se mantuvieron a 36°C en una atmósfera humidificada de 10% CO₂/90% aire. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

5.3. Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo diariamente de cultivos de células RCE1(5T5) a partir del tercer día en cultivo y hasta el 10 día después de la siembra cuando ya se había formado un epitelio estratificado compuesto por 4-5 capas celulares. Para ello, las células se cultivaron en cajas de 60 mm a la densidad indicada. Para la extracción, se retiró el medio y las células se lavaron dos a tres veces con PBS-DEPC frío. Posteriormente las células se lisaron con TRIzol™ por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 500 µl de cloroformo por cada mililitro de lisado, incubando 3 min a TA. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se colectó la fase acuosa resultante y el RNA se precipitó por 10 min mediante la adición de isopropanol a TA. Se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C, la pastilla se lavó con etanol al 75% (v/v) en H₂O DEPC, y se centrifugó nuevamente a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente la muestra se resuspendió en agua DEPC para su uso posterior. La integridad del RNA se verificó por la presencia de los RNAs ribosomales 28s y 18s en un gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 mg/ml de Bromuro de Etidio (EtBr) a una concentración final de 1.25 mM. La concentración y pureza del RNA se determinó espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 260 nm y a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA.). El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso. Cabe señalar que durante la fase de crecimiento exponencial, previo a la extracción, las células alimentadoras 3T3 se removieron con verseno (PBS + 0.02%(p/v) EDTA) antes de proceder a la extracción con TRIzol™.

5.4. Síntesis de cDNA.

La concentración de RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000, verificando su pureza mediante la evaluación de los cocientes de absorción a 260nm/280nm y 260nm/230nm. Una alícuota del extracto de RNA total, conteniendo 4 µg de RNA, se sometió a transcripción reversa con SuperScript™II Reverse Transcriptase, para obtener cDNA total siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, el cDNA se amplificó utilizando el Taq PCR Core Kit (Qiagen, Cat No/ID: 201225; Hombrechtikon, Switzerland).

5.5. RT-PCR Cuantitativa (RT-qPCR)

Se obtuvo cDNA a partir de RNA total aislado de células RCE1(5T5) cultivadas durante 3-10 días en tres experimentos independientes. La amplificación se hizo mediante RT-qPCR utilizando el kit Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) siguiendo las especificaciones del fabricante. Estos experimentos se llevaron a cabo en un termociclador StepOne™ system (Applied Biosystems, Life technologies).

Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la Tabla 1 y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 2. Como control endógeno se utilizaron oligonucleótidos para amplificar al mensajero que codifica a la proteína ribosomal ácida P0 (PR-P0) cuya expresión no cambia a lo largo del proceso de proliferación y diferenciación (Gómez-Flores et al., 2011). El punto de adquisición del SYBR Green se fijó al final del paso de extensión número 1. La curva de especificidad de productos (Melt) se llevó a cabo como un gradiente de 60°C a 95°C, con una duración de 15 segundos en el primer paso y 5 segundos en cada temperatura posterior.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.

Primer.	Secuencia 5'-3'
PRPO Forward	GCAGGTGTTTGACAATGGCAGC
PRPO Reverse	GCCTTGACCTTTTCAGCAAGTGG
Pax6 Forward	CATCTCCCGAATTCTCGCAGGTGTC
Pax6 Reverse	CCCTCGGACAGTAATCTGTCTCGG
Sox9 Forward	TCATGAAGATGACCGACGAG
Sox9 Reverse	TTCGCTCTCCTTCTTGAGGT
Citoqueratina K3 Forward	TCCGTCACAGGCACCAAC
Citoqueratina K3 Reverse	TGCGTTTGTTGATTCGTCT
p63 Forward	TGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTACT
p63 reverse	ATGTCGAAATTGCTCAGGGATTTTCAGA

Tabla 2. Condiciones de la reacción de RT-qPCR.

Temperatura (°C).	Tiempo.	Número de ciclos.
95	10 min	1
95	15 seg	40
60	30 seg	
72	30 seg	

5.6. Inmunotinción de cultivos de células RCE1(5T5).

Las células RCE1(5T5) se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio de 18.0 mm x 18.0 mm, se fijaron con metanol a -20°C por 5 min, para dejarse secar al aire, a TA; o bien, se fijaron con paraformaldehído al 3.5% (p/v) en PBS. En cualquiera de los dos casos, la fijación se llevó a cabo en los tiempos de cultivo indicados. Cuando los cultivos se fijaron con metanol, éstos se almacenaron en desecador a -20°C o bien, cuando se fijaron con paraformaldehído, se almacenaron a 4°C en PBS que contenía 15 mM de azida de sodio. Para la inmunotinción, los cultivos fijados con metanol previamente se rehidrataron con PBS por 15 minutos. Las células se bloquearon con albúmina de suero de bovino (BSA) al 5%(p/v) en PBS. Los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente por 1h (ver Tabla 3). Posteriormente, se lavaron con 0.05%(v/v) Tween 20 en PBS, para ser incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 3). Finalmente, las preparaciones fueron lavadas con 0.05%(v/v) Tween 20 en PBS y se montaron con Vectashield/DAPI (Vector Laboratories, San Francisco CA), y se guardaron a 4 °C en la oscuridad hasta ser observadas. Para los controles negativos, los cultivos se sometieron al protocolo de tinción descrito, eliminando el paso de inmunotinción con el anticuerpo primario. El análisis confocal se realizó en un Leica high-speed confocal/multiphoton system Modelo TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se realizaron secciones ópticas seriales XYZ y XZY de 0.2 a 0.4µm. Para impedir interferencia de las sondas fluorescentes, se tomaron imágenes de la misma sección óptica como canales independientes, y se analizaron con el programa Leica Application Suite LAS AF v.1.8.0 (Leica Microsystems). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 3. Anticuerpos usados en la inmunotinción.

Anticuerpo (No. Catálogo)	Especificidad	Compañía	Dilución
Ab anti hSox9 (E-9) IgG _{2a} (sc-166505)	Monoclonal contra aa. 36-55 cercano al N-terminal.	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Biotin-XX (B-2763)	Policlonal contra cadenas ligera y pesada de gamma globulina	Thermo Fisher	1:500
Fluorescent Streptavidin Kit (SA-1200)	Estreptavidina reactiva contra biotina	Vector Laboratories	1:500

5.7. Análisis de la expresión de Sox9 en el transcriptoma de 3 etapas del proceso de diferenciación.

Previamente, en el laboratorio, con base a la expresión de Oct4, Δ Np63 α , Vimentina, Pax6 y algunos marcadores del proceso de diferenciación terminal de las células del epitelio corneal, se definieron 3 etapas del programa de expresión de la diferenciación de las células RCE1(5T5) (Ortiz-Melo et al, manuscrito en preparación): i) Etapa proliferativa, no-diferenciada, (4 días en cultivo); ii) etapa de confluencia/inicio de la expresión del proceso de diferenciación (“compromiso”), (6 días en cultivo); y iii) células diferenciadas (10 días en cultivo). Subsecuentemente se extrajo RNA total de cada una de las tres etapas, y se generaron bibliotecas de cDNA con el kit TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA). Estas fueron secuenciadas (RNAseq) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM); usando un sistema Illumina GA_{11x} Genome Analyzer_{11x} (Illumina, Inc., San Diego, CA), con la configuración para la lectura de extremos emparejados o “Paired-end reads”

con 75 bp de marco de lectura y una media de 7,500,000 lecturas por muestra obtenida (Ortiz-Melo et al., manuscrito en preparación).

Posteriormente, el análisis se llevó a cabo con herramienta informática Geneious (Geneious software v.9.1.8), para las lecturas de los datos crudos, remoción de adaptadores y lectura de pares de secuencias. Las secuencias pareadas se mapearon usando el genoma de referencia de *Oryctolagus cuniculus* (OryCun2.0; GCF_000003625.3; 29098 coding genes), usando el mapeo de RNAseq de Geneious. Las medidas de expresión de TPM, RPKM y FPKM se calcularon con las anotaciones de CDS (secuencias codificantes) del genoma de referencia. (Ortiz-Melo et al, manuscrito en preparación).

Para el caso concreto de este trabajo, se realizó data mining en la base de datos del transcriptoma de células RCE1(5T5) generada en el laboratorio, con el propósito de definir los niveles de expresión, en transcritos por millón (TPM), para cada uno de los genes que codifican para los factores de transcripción pertenecientes a la familia Sox, y para cada una de las tres etapas del proceso de diferenciación.

5.8. Manejo estadístico.

Las gráficas de las cinéticas de expresión fueron realizadas en el programa Sigmaplot v. 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) a partir de los resultados de expresión relativa normalizada. Los valores expresión se determinaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando como valor base la expresión de los mensajeros determinada el día 3 de cultivo, y usando como control endógeno la expresión del gen PRP0.

A los resultados normalizados de cuantificación relativa de los genes analizados, se les aplicó la prueba de comparación de medias ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Dunnett, tomando como “control” al día 3 ya que todos los resultados se normalizaron con el Ct de dicho día. La prueba de Dunnett permite determinar con un intervalo de confianza cuales medias de las tres réplicas experimentales realizadas fueron significativamente diferentes de la media del día 3. Esta prueba estadística fue realizada en el programa Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA)

6. RESULTADOS.

6.1 Cinética de expresión de Pax6 y Sox9.

Resultados previos sugirieron que, en células de epitelio corneal de humano, el factor de transcripción Sox9 es un regulador muy importante del potencial proliferativo y del proceso de diferenciación de este tipo epitelial (Menzel-Severing et al., 2018). Considerando que la evidencia acumulada ha llevado a postular al factor de transcripción Pax6 como regulador maestro del proceso de diferenciación del epitelio corneal (García-Villegas et al., 2009; Kitazawa et al., 2017), y con el propósito de examinar la actividad biológica de Sox9, primero examinamos la relación temporal entre la expresión del mensajero que codifica para este factor, y la expresión de Pax6. Para ello, diariamente se extrajo RNA total de cultivos de células RCE1(5T5) a partir del día 3 en cultivo y hasta el día 10 después de la siembra, y se determinó por RT-qPCR la expresión de los mensajeros que codifican para Sox9, Pax6, para $\Delta Np63\alpha$ que es un factor de transcripción relacionado con la potencialidad y/o con la alta actividad proliferativa de las células de epitelios estratificados (Di Iorio et al., 2005; Pellegrini et al., 2001) y para la citoqueratina K3, ligada a la expresión del fenotipo diferenciado (Schermer et al., 1986).

Como se observa en la Figura 8, la expresión del mensajero que codifica para Pax6 inició su incremento a partir del día 4 en cultivo, antecediendo a la confluencia por 1 a 1.5 días y aumentó hasta alcanzar niveles 7 veces superiores el día 8 después de la siembra (Fig. 8A). Posteriormente, su expresión se mantuvo en niveles 4 a 5 veces los detectados inicialmente. Al examinar la significancia de este resultado (Fig. 8B), se encontró que el aumento en la expresión de Pax6 fue significativo a partir del día 6 de

cultivo, cuando las células alcanzaron la confluencia (Fig. 8A, flecha) y manteniéndose hasta el último día del experimento.

En contraste, Sox9 presentó un comportamiento bifásico. El aumento en su expresión se manifestó el día 4 después de la siembra, en cultivos proliferativos, alcanzando niveles 3 veces superiores a los cuantificados un día antes (Fig. 8A). Posteriormente, su expresión disminuyó hasta presentar niveles similares a los basales (día 3 después de la siembra) los días 5, 6 y 7 de cultivo, para aumentar hasta 2 veces los niveles basales el octavo día en cultivo (Fig. 8A). Finalmente, cuando las células formaron epitelios estratificados, maduros, los niveles de Sox9 se redujeron hasta el final del experimento (Fig 8A). El análisis de los resultados, mostró que el único cambio estadísticamente significativo se encontró en los cultivos proliferativos de 4 días (Fig.8C).

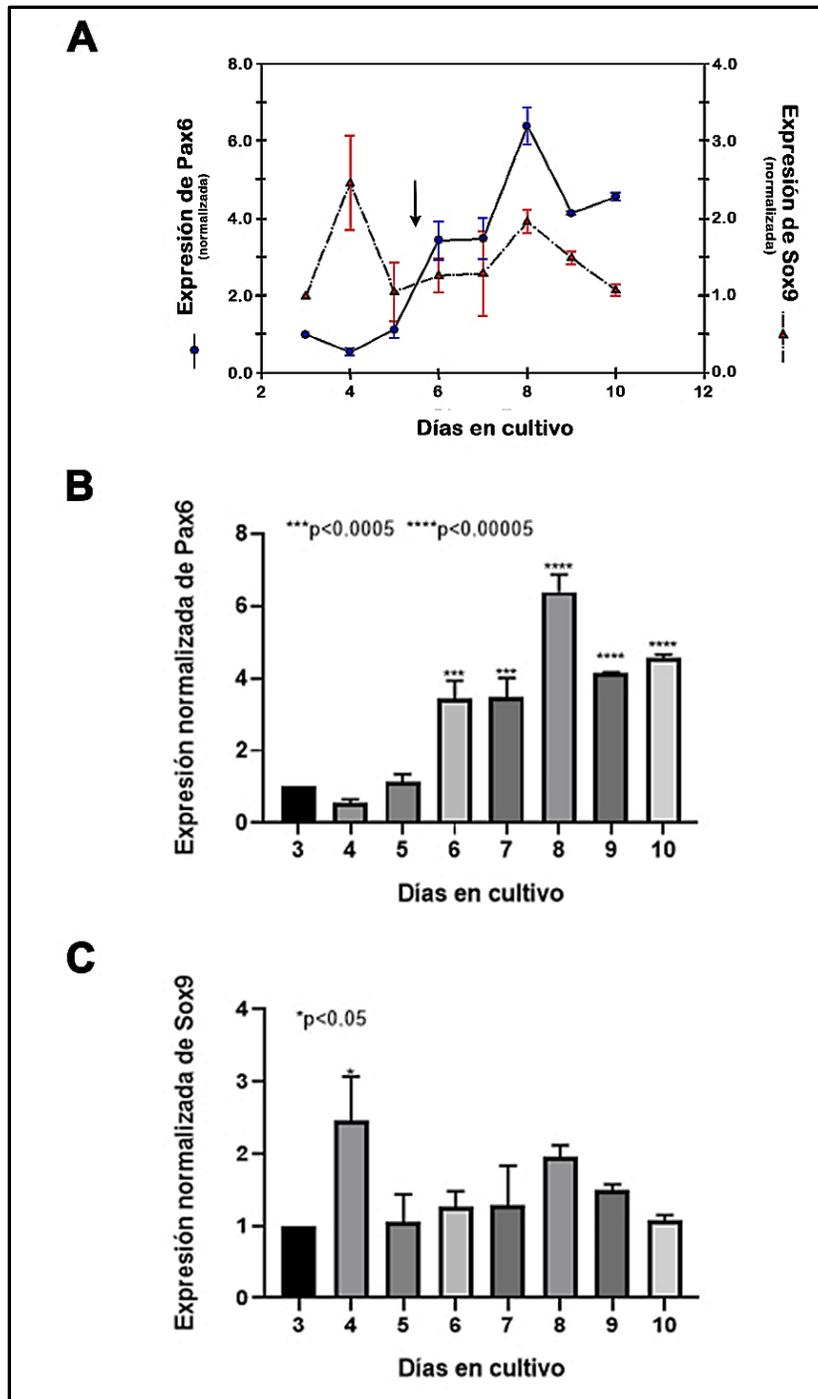


Figura 8. Expresión de los factores de transcripción Pax6 y Sox9 durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5). (A) Muestra la expresión de Pax6 y Sox9 en células RCE1(5T5) durante los días de cultivo 3 a 10, determinada por RT-qPCR (ver métodos). La flecha indica el día en que se alcanzó la confluencia en cultivo. (B) Presenta el análisis estadístico de los resultados presentados en (A) para Pax6. La significancia se calculó mediante la prueba de ANOVA-Dunnet, utilizando como referencia base el día 3 de cultivo. (C) Análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA-Dunnet para la expresión de Sox9.

6.2. Análisis comparativo de la expresión de Sox9 respecto a la expresión de los mRNA que codifican para la citoqueratina K3 y para el factor de transcripción Δ Np63 α .

Con el propósito de establecer la relación temporal entre la expresión del fenotipo terminal con la expresión de Pax6 y Sox9, evaluamos en la misma serie de experimentos, la expresión del mensajero que codifica para la citoqueratina K3 ligada a la diferenciación terminal del epitelio corneal. Como se observa en la Figura 9, la citoqueratina K3 inició el cambio sensible en su expresión a partir de los días 5-6 de cultivo, aumentando de manera continua hasta alcanzar niveles máximos el día 10 después de la siembra, cuando ya habían formado un epitelio estratificado de 4-5 capas (Fig.9A) y alcanzando niveles 18 veces superiores a los detectados inicialmente. Este incremento presentó un retraso respecto al cambio en la expresión del factor de transcripción Pax6 (Fig. 9A). La prueba de Dunnet mostró, que los resultados fueron estadísticamente significativos a partir del día 7 en cultivo (ver Figura 10B).

Para establecer con mayor precisión el intervalo entre la expresión de Pax6 y la citoqueratina K3, y la tasa de incremento de los mensajeros que codifican para Pax6 y la citoqueratina K3, se graficaron los niveles de expresión de estos marcadores moleculares contra el tiempo en cultivo en escala logarítmica; y el inicio en la expresión de éstos se estimó a partir de la intersección de la parte lineal de la curva con el eje de las abscisas. Como se puede apreciar en la Figura 9, el inicio en el cambio en la expresión de Pax6 se presentó el día 4 en cultivo, y subsecuentemente, 24-30 horas después se inició el cambio significativo en la expresión de la queratina de manera similar a lo previamente reportado (Fig. 10A).

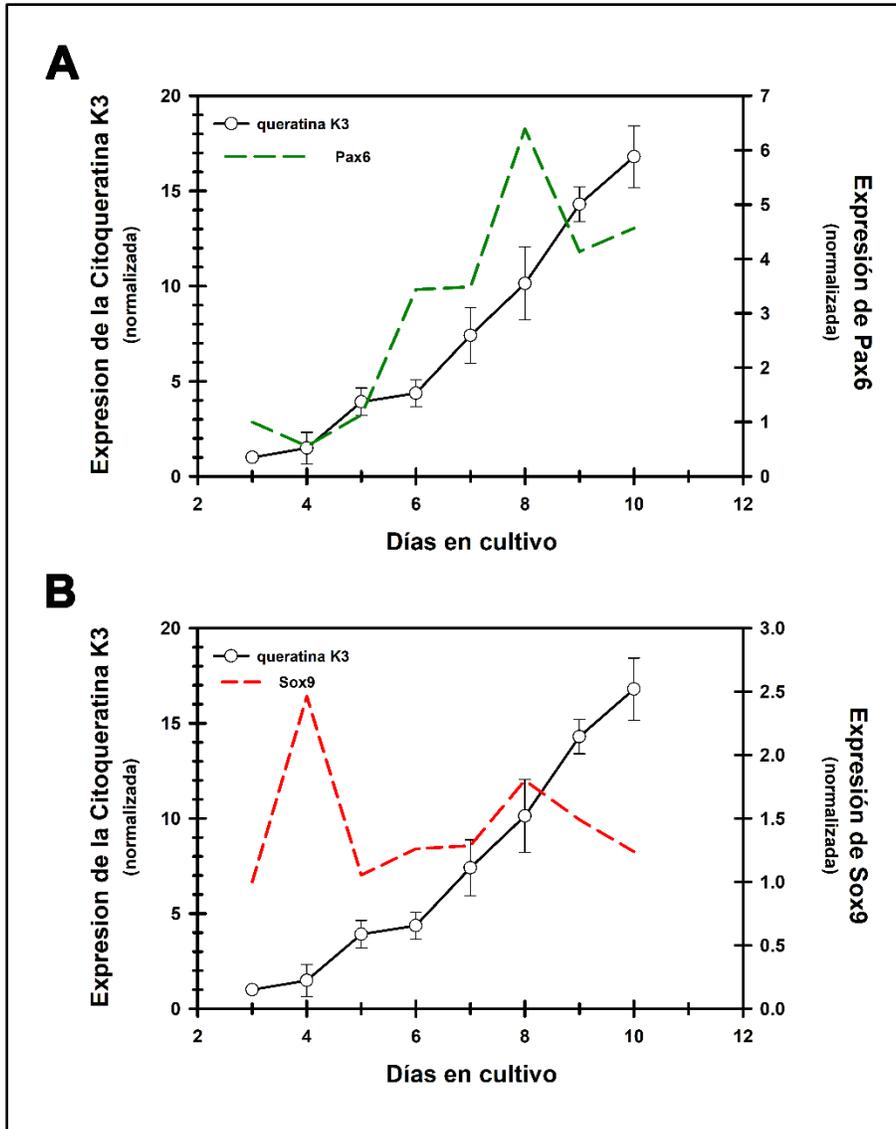


Figura 9. Expresión del mensajero que codifica para la citoqueratina K3. Comparación con el patrón de expresión de Pax6 (A) y de Sox9 (B). La expresión de la citoqueratina se determinó por RT-qPCR. La expresión de Pax6 (verde) y Sox9 (rojo), se representa en líneas punteadas y corresponde a los resultados presentados en la figura 8A.

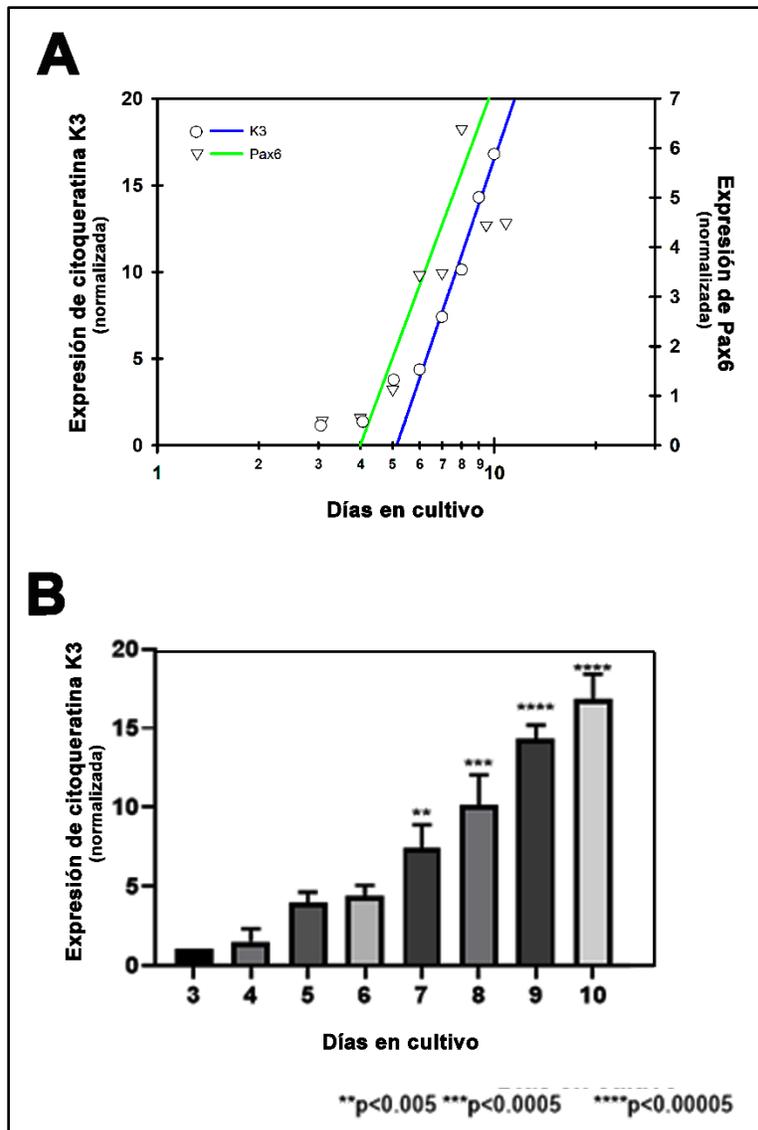


Figura 10. (A) El inicio en el incremento en los niveles de los marcadores de diferenciación se estimó con base al cambio en la expresión determinado por RT-qPCR para cada día de cultivo; graficando en escala logarítmica el tiempo en cultivo. El tiempo de inicio se calculó por extrapolación de la parte lineal de la curva hacia el eje de las abscisas. Regresión lineal para Pax6 (verde) $r^2=0.919$; para la citoqueratina K3 (azul) $r^2=0.995$. (B) Análisis ANOVA-Dunnett de la expresión de la citoqueratina K3.

Por otra parte, se registró que el cambio en la expresión de $\Delta Np63\alpha$ siguió un comportamiento similar al observado para la expresión de Pax6 (Figura 11). En este caso, hubo un aumento de expresión sostenido desde el día 4 de cultivo y hasta el día 8, cuando el factor de transcripción alcanzó niveles de expresión 4 veces superiores a

los encontrados el día 3 de cultivo (Fig. 11) Cabe señalar que, de manera interesante, el nivel de expresión de Δ Np63 α fue máximo el mismo día en el que Sox9 alcanzó su segundo pico en expresión (día 8 de cultivo, Fig. 11A), al igual que Pax6 (Fig 11B). Al hacer el análisis estadístico de los resultados, encontramos que los niveles de Δ Np63 α sólo fueron significativos para el día 8 de cultivo (Fig. 12).

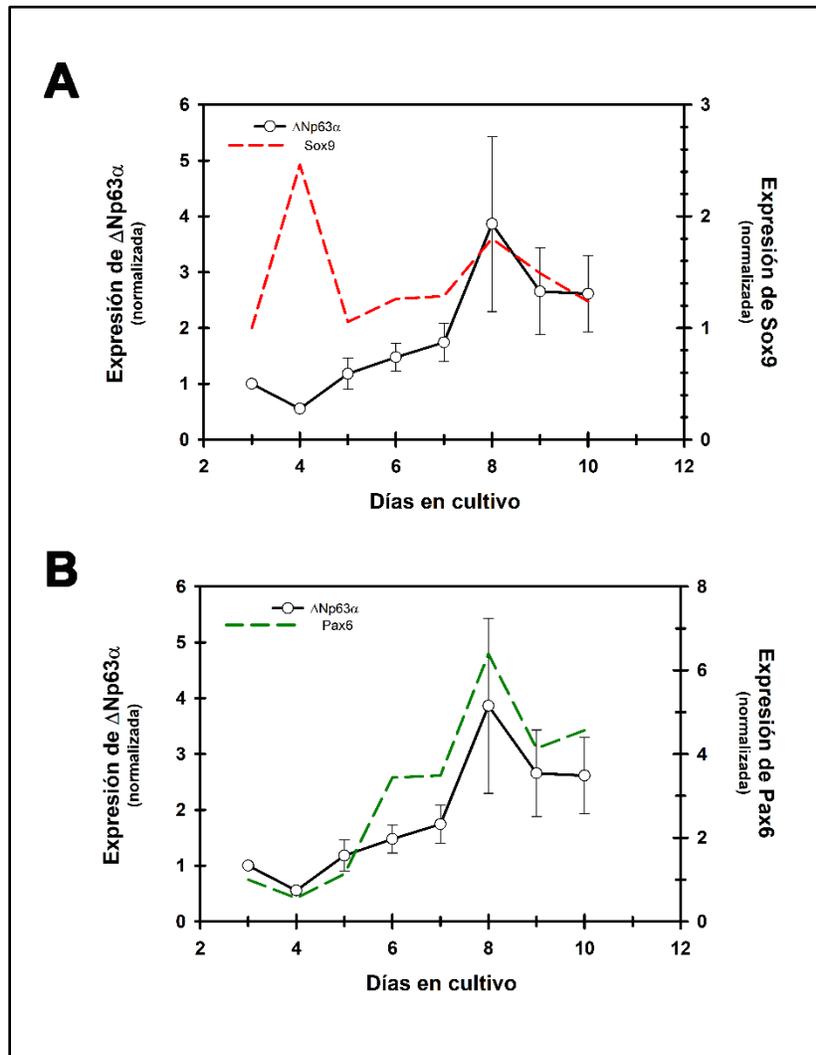


Figura 11. Expresión del mensajero que codifica para el factor de transcripción Δ Np63 α . Comparación con el patrón de expresión de Sox9 (A) y de Pax6 (B). La expresión de Δ Np63 α se determinó por RT-qPCR. La expresión de Pax6 (verde) y Sox9 (rojo), se representa en líneas punteadas y corresponde a los resultados presentados en la figura 8A.

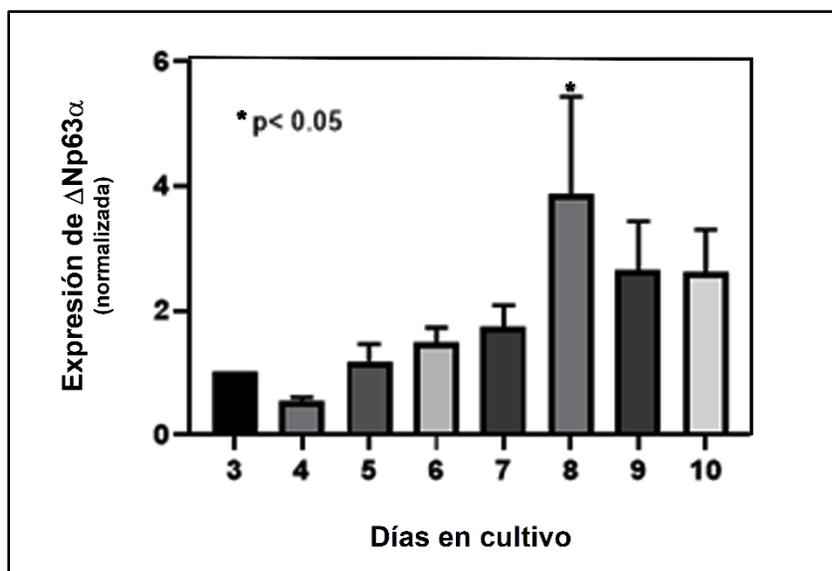


Figura 12. Análisis ANOVA-Dunnet de la expresión de $\Delta Np63\alpha$, donde se muestra que sólo el día 8 de cultivo tuvo un cambio significativo respecto al tercer día de cultivo.

6.3. Inmunolocalización de Sox9 en cultivos de células RCE1(5T5) a diferentes tiempos de cultivo.

En siguiente término, se analizó la inmunolocalización de Sox9 en células RCE1(5T5), a diferentes tiempos de cultivo. En la figura 13 se muestra que en colonias de 4 días de crecimiento, la inmunotinción de Sox9 es principalmente citoplásmica y en algunas células es intranuclear localizándose principalmente en células de la periferia de la colonia (ver Fig. 13D-F). En esta caso, la señal nuclear fue débil como se puede observar en un corte transversal como el que se muestra en la Figura 15A.

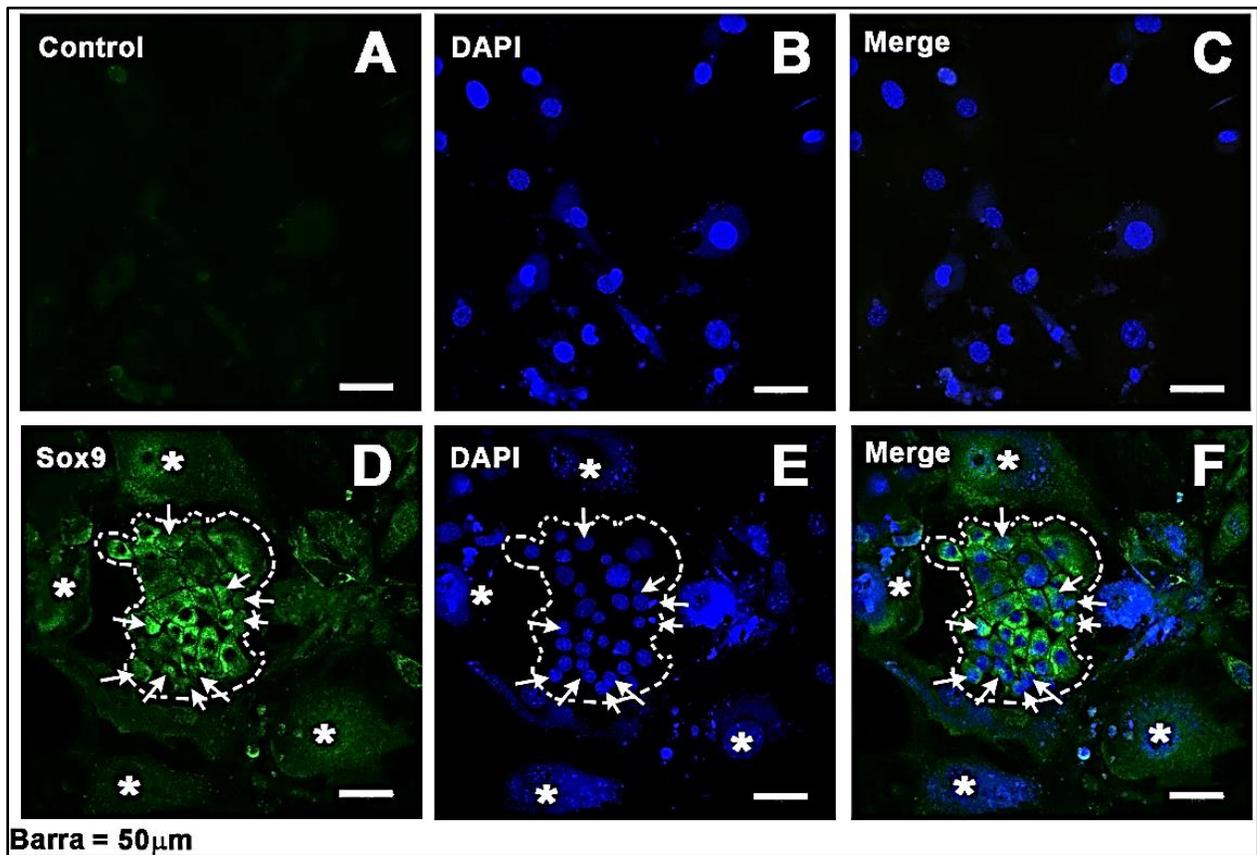


Figura 13. Inmunolocalización de Sox9 en colonias de células RCE1(5T5). En (A) se muestra el control negativo en el que no existió tinción específica. (B) corresponde al mismo campo visual contrateñido con DAPI (Azul). En (C) se muestra la proyección máxima sobrelapada de los dos canales registrados. En (D) se observa la inmunotinción con el anticuerpo anti-Sox9. En este caso, se observa tinción nuclear en células localizadas en el borde de la colonia (flechas), así como también se aprecia tinción citoplásmica en la mayor parte de la colonia. Nótese que también existió tinción de las células 3T3 alimentadoras (asterisco *). (E) Mismo campo visual que en (D), teñido con DAPI, y (F) proyección máxima de los dos canales sobrelapados que se muestran en D y E.

Al realizar la inmunotinción de epitelios generados 10 días después de la siembra, se observó que el número de células positivas para Sox9 disminuyó notablemente, aunque se siguió observando en algunas las células basales la presencia de Sox9 en el citoplasma (Fig. 14 A). Estos resultados se hicieron notables al hacer cortes ópticos transversales de cultivos de 6 y 8 días (Fig. 15 B, C). Cabe resaltar que la

inmunolocalización nuclear de Sox 9 se encontró principalmente en células del borde migratorio/proliferativo de las colonias (ver Fig 15B, flechas).

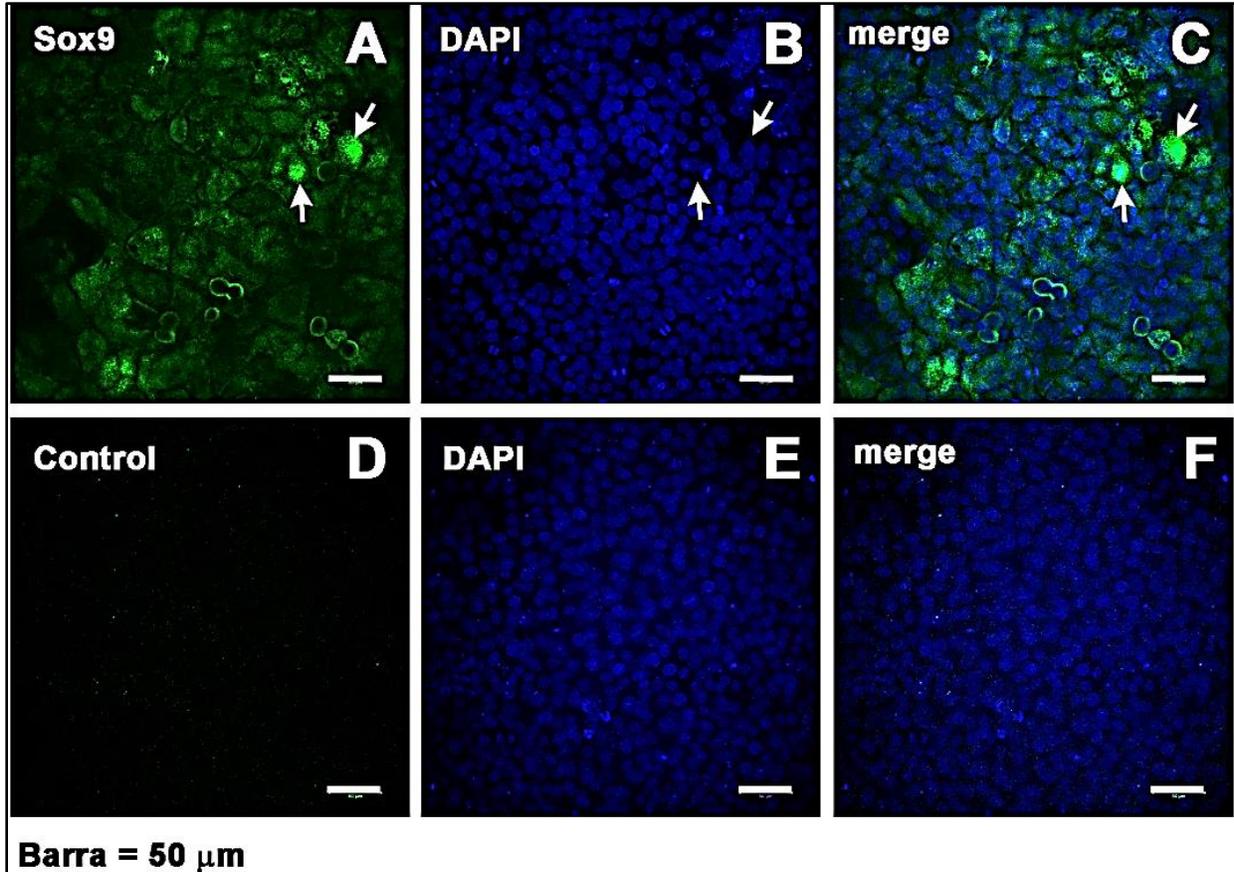


Figura 14. Inmunolocalización de Sox9 en células RCE1(5T5), 10 días después de la siembra. En (A) se muestra la inmunotinción con el anticuerpo anti-Sox9. En este caso, se observa tinción nuclear en algunas células (flechas). Estas se localizaron basalmente; así también se aprecia tinción citoplásmica en algunas células del epitelio. (B) corresponde al mismo campo visual contrateñido con DAPI (Azul). En (C) se muestra la proyección máxima sobrelapada de los dos canales registrados. En (D) se observa el control negativo en el que no existió tinción específica. (E) Mismo campo visual que en (D), teñido con DAPI, y (F) proyección máxima de los dos canales sobrelapados que se muestran en D y E.

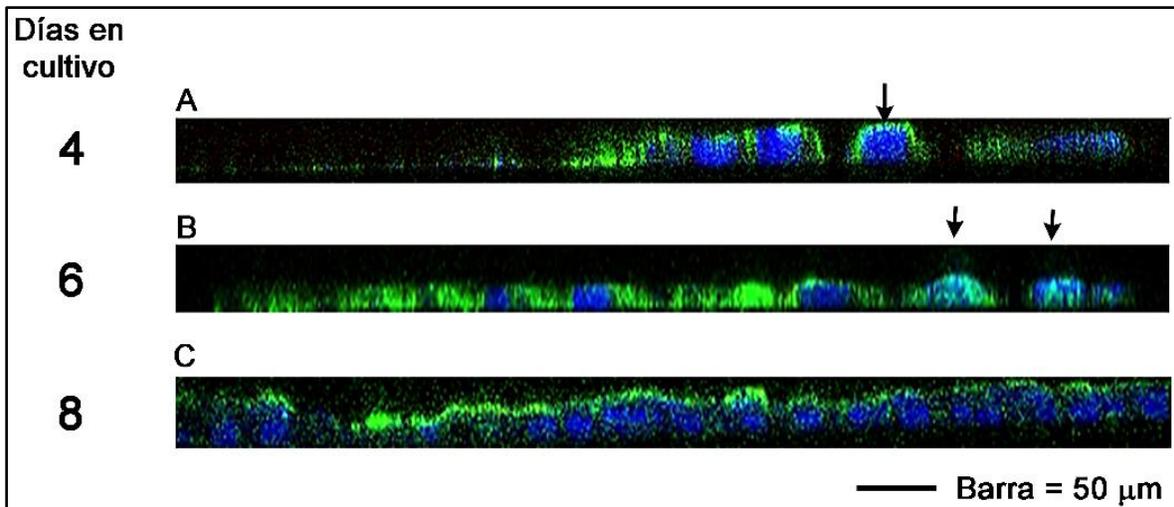


Figura 15. Cortes ópticos transversales de células RCE1(5T5) a los 4 (A), 6 (B) y 8 (C) días en cultivo. Se muestra el patrón de inmunotinción obtenido con el anticuerpo dirigido contra Sox9. Las flechas indican aquéllas células que presentan tinción nuclear para Sox9 (flechas), las cuales se localizaron en el borde migratorio/proliferativo de la colonia.

6.4. Expresión diferencial de Sox9 y otros genes de la familia Sox. Análisis del transcriptoma de 3 fases del proceso de diferenciación.

Recientemente, mediante la metodología de RNAseq en nuestro laboratorio se obtuvieron los transcriptomas de 3 etapas del proceso de diferenciación: i) células proliferativas, no diferenciadas; ii) células confluentes, en las que se inicia el proceso de diferenciación, y iii) células diferenciadas. Utilizando la base de datos generada, analizamos el patrón de expresión de Sox9 en cada una de estas tres etapas. Como se observa en la figura 16, los niveles de expresión de este factor de transcripción reflejaron los mismos resultados encontrados mediante la cuantificación por RT-qPCR. En células proliferativas, Sox9 tuvo niveles 1.8 veces superiores a los encontrados en células confluentes (Fig. 16); en contraste, el número de transcritos por millón detectado en células diferenciadas fue aproximadamente 12% menor al de células proliferativas (Fig. 16).

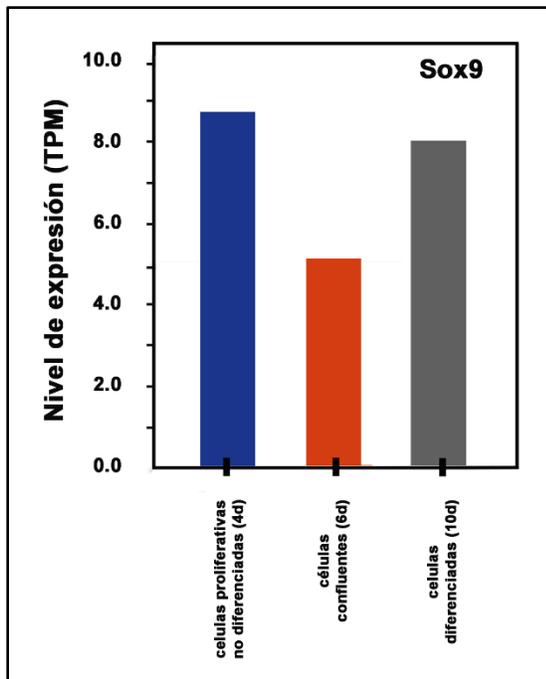


Figura 16. Niveles de expresión de Sox9 en transcritos por millón (TPM), detectados en tres etapas distintivas de las células RCE1(5T5).

Finalmente, se determinaron los niveles de expresión en transcritos por millón de otros factores pertenecientes a la familia Sox en células RCE1(5T5). Como se puede apreciar en la Figura 17, a lo largo del crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5) se expresan Sox1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 13 y 14. De estos, los más interesantes parecen ser Sox4, que en células no diferenciadas alcanza niveles de expresión 5 veces mayores a los encontrados en células diferenciadas (Fig. 17); y Sox7 cuya expresión parece seguir un patrón ligado al proceso de diferenciación con niveles mayores en células confluentes y en células terminalmente diferenciadas (Fig. 17). Por otra parte, Sox10 se expresa en niveles bajos, siguiendo un comportamiento similar a Sox9 (Fig. 17), y Sox11, que presenta un patrón de expresión semejante a Sox4. Cabe señalar que se encontraron 3 isoformas de Sox13, de las que ilustramos sólo la más abundante, ya que todas siguieron un patrón similar.

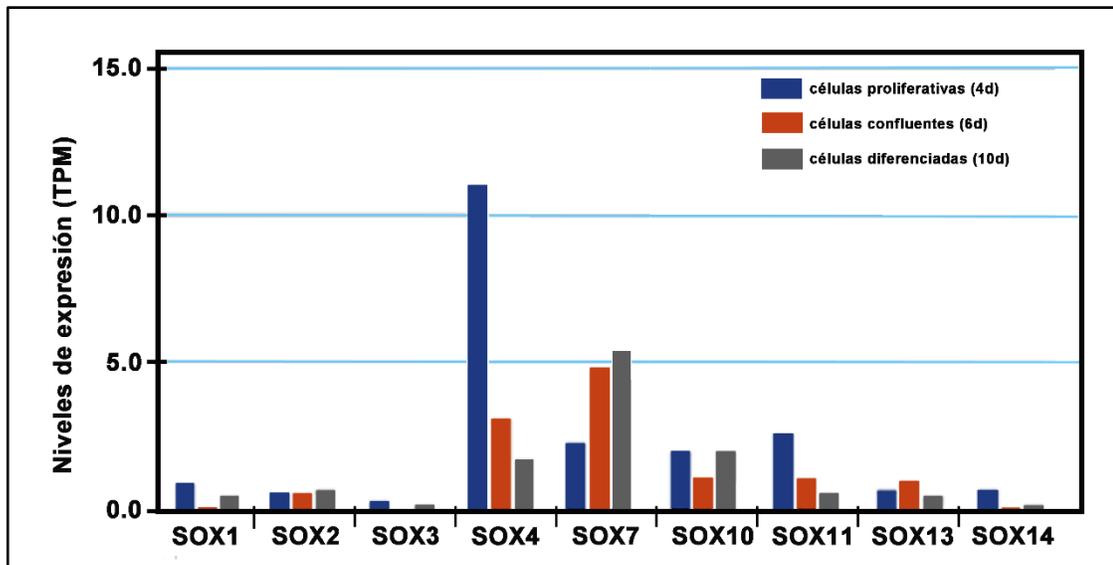


Figura 17. Expresión de mensajeros que codifican a factores de transcripción de la familia SOX, determinado por RNAseq para cada una de las fases de crecimiento y diferenciación que se observan durante el cultivo de las células RCE1(5T5).

En conjunto, los resultados nos demuestran que Sox9 se expresa en células RCE1(5T5) siguiendo un comportamiento bifásico, con su mayor expresión en células proliferativas en donde presenta localizado en el núcleo. Bajo estas condiciones, Sox9 se observa predominantemente en el borde migratorio/proliferativo de las colonias en crecimiento. Posteriormente, su expresión decae cuando las células alcanzan la confluencia y aumenta nuevamente en células diferenciadas, sugiriendo su participación en las primeras etapas del proceso de diferenciación.

7. DISCUSIÓN.

Desde el punto de vista de la Biología de la superficie ocular es de interés primordial entender los mecanismos que habilitan a las células basales del epitelio corneal para responder a la demanda excesiva impuesta por el balance existente entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular asociadas al mantenimiento y renovación del tejido (Lu et al., 2001; Lavker et al., 2004). En este ámbito, una de las preguntas esenciales intenta descifrar la manera en la que el proceso de diferenciación del epitelio corneal es regulado. Uno de los factores de transcripción que se plantea como candidato para llevar a cabo esta función, es el codificado por el gen homeótico Pax6, señalado como “regulador maestro” del desarrollo de las estructuras oculares en diferentes taxones de Metazoarios (Kodama and Eguchi., 1994; Hill and Davidson, 1994; Gehring, 1996). Hasta ahora, la evidencia apunta a Pax6 debido a que su expresión ectópica conduce a la formación de ojos ectópicos en anuros (Chow *et al.* 1999), así como también ocurre al expresar Pax6 de diferentes especies en *D. melanogaster* (Halder et al., 1995; Loosli et al., 1996; Glardon et al., 1997; Tomarev et al., 1997). Así también proviene del análisis de mutaciones heterocigóticas que ocasionan alteraciones en la formación de estructuras del iris o la córnea (Davis, 2003; Kroeber *et al.*, 2010), y producen la ausencia parcial o total de estructuras oculares en los desórdenes del grupo MAC (Microftalmia, Anoftalmia y Coloboma) (Lima-Cunha *et al.* 2019). No obstante, los únicos resultados que sugirieron la participación directa de Pax6 en el desarrollo de estructuras oculares, provinieron del análisis de la regulación del desarrollo del cristalino y de la retina (Li et al., 1994; Cevkl et al., 1994, 1995; Carriere et al., 1993).

La posible participación de Pax6 en el desarrollo del epitelio corneal se planteó con base en experimentos que demostraron su expresión en la córnea y en la conjuntiva (Koroma et al., 1997), y por la presencia de secuencias consenso para su unión en el promotor de la citoqueratina K12 (Shiraishi et al., 1998; Liu et al., 1999), que es un marcador de diferenciación asociado al fenotipo terminal de este epitelio. Posteriormente, con base en la temporalidad de su expresión respecto a marcadores de la diferenciación terminal, y debido a que la sobreexpresión de sus dos isoformas predominantes promueve la pérdida del potencial proliferativo y la expresión del fenotipo terminal, se propuso su función como regulador maestro del proceso de diferenciación utilizando como modelo a la línea celular RCE1(5T5) (García-Villegas et al., 2009). Esta propuesta fue reforzada por evidencia obtenida en epitelio corneal humano (Sasamoto et al., 2016; Kitazawa et al., 2017) y por experimentos donde la expresión ectópica de Pax6 en células troncales de folículo piloso ocasiona la diferenciación hacia el epitelio corneal (Yang et al., 2009).

El programa de diferenciación del epitelio corneal está sujeto a una regulación compleja, en la que Pax6 desempeña una función clave. Recientemente, resultados de nuestro laboratorio sugieren que este proceso regulatorio implica al menos a 7 factores de transcripción Pax6, Oct4, KLF4, Cux1, Six4, SP1 y Sox9 (Ortiz-Melo et al., manuscrito en preparación). Con base en lo anterior, y considerando que recientemente se propuso a Sox9 como principal regulador del estado no diferenciado de las células basales del limbo, y que su disminución temporal inicia el proceso de diferenciación (Menzel-Severing et al., 2018), en este trabajo nos propusimos analizar la actividad de Sox9 durante la diferenciación del epitelio corneal.

Sox9 es un factor de transcripción que se expresa en diversas poblaciones celulares, siendo abundante en tejidos de origen ectodérmico y neuroectodérmico. En epidermis de humano se localiza predominantemente en las células de la vaina interna del folículo piloso, en las glándulas sebáceas y en las células basales de la epidermis (Shi *et al.* 2013). Adicionalmente, estos autores observaron que la diferenciación de los queratinocitos es acompañada por una la reducción en la expresión de Sox9, mientras que su sobre-expresión aumenta el potencial proliferativo (Shi et al., 2013). De manera similar, se demostró que Sox9 se encuentra en la vaina externa del folículo piloso humano, en el “bulge” del cuero cabelludo (Purba et al., 2015). En conjunto, estos resultados sugirieron que Sox9 se expresa en poblaciones celulares con alto potencial proliferativo o con características de células troncales/progenitoras en diferentes tejidos.

Nuestros resultados demuestran que Sox9 tiene una curva de expresión bifásica con dos máximos en su expresión, el primero durante la fase proliferativa de los cultivos y el segundo, al iniciarse la expresión del fenotipo diferenciado. Este hecho fue confirmado al hacer el perfil transcripcional de las células epiteliales en las tres etapas del proceso. De estos dos máximos de expresión se puede decir lo siguiente:

- 1) El primer pico se presentó a los 4 días de cultivo, cuando las células proliferativas forman colonias. En este caso, los niveles alcanzados fueron los mayores encontrados a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo. De esta manera, en las colonias en crecimiento, Sox9 inmunolocalizó en el núcleo de las células del borde proliferativo/migratorio de las colonias. Estos resultados coinciden con algunos de los resultados previos donde Sox9 co-localizó con $\Delta Np63\alpha$, Oct4, y Ki67 en las células proliferativas de las colonias de epitelio corneal de humano y en células basales del

epitelio limbal (Menzel-Severing et al, 2018). Asimismo, Menzel-Severing y sus colaboradores (2018) demostraron que el knock-down de Sox9 en células de epitelio corneal humano disminuye la capacidad proliferativa. En conjunto, nuestros resultados, el trabajo de estos autores y los estudios en queratinocitos epidermales sugieren que Sox9 regula el potencial proliferativo de las células epiteliales, y posiblemente esté ligado al carácter troncal o bien regule la proliferación de precursores tempranos del tejido.

No obstante, nuestro trabajo resalta una serie de contrastes con resultados previos. Mientras en células RCE1(5T5) la expresión de Sox9 se presentó intranuclearmente en las células del borde migratorio/proliferativo, los experimentos hechos en epitelio corneal humano sugieren que la localización nuclear de Sox9 se observa en células que se encuentran en etapas tempranas del proceso de diferenciación o que expresan el fenotipo terminal ya sea in vitro, o in vivo, en las capas suprabasales del epitelio (Menzel-Severing et al., 2018). En nuestro sistema experimental la localización nuclear de Sox9 fue en células basales, mientras que en células suprabasales fue citoplásmica.

En este sentido, la distribución subcelular de los factores de transcripción puede desempeñar un efecto regulador sobre la actividad de éstos (Lewis et al.1996; Vandromme et al. 1996). Aunque se ha reportado que la distribución citoplásmica de los factores de transcripción puede corresponder a las proteínas recién sintetizadas, se demostró en células de Sertoli que Sox9 interacciona con el citoesqueleto de Tubulina para ser retenido en el citoplasma hasta que se requiere su actividad transcripcional (Malki et al., 2005). Esto se traduce en una inmunolocalización citoplásmica predominante en algunas etapas de la diferenciación de este tipo celular (Malki et al.,

2005). Este proceso también se ha descrito para otros factores de transcripción como p53 y c-myc, y para proteínas virales que también son retenidas por los microtúbulos (Campbell 2003). De manera similar a lo observado en este trabajo, en tejido cardíaco Sox9 localiza nuclearmente durante la valvulogénesis embrionaria, mientras que en etapas postnatales presenta una distribución citoplásmica (Gallina et al. 2018). Esta evidencia indica la posibilidad de que Sox9 tenga una localización nuclear en tejidos en desarrollo, regulando a otros genes implicados en proliferación como AP-1 y p53 (Garside et al. 2015); mientras que en tejidos diferenciados su distribución sea citoplásmica (Chu et al., 2007; Galina et al., 2018).

2) El segundo pico de expresión ocurre 8 días después de la siembra y dos días después de alcanzarse la confluencia, cuando la estratificación y la expresión del fenotipo terminal se encuentran activos. Este pico fue menos pronunciado que el detectado en los cultivos proliferativos y su pendiente inicial fue similar a la del cambio en la expresión de la citoqueratina K3, lo que sugiere su participación en la expresión del fenotipo terminal. Más aún, este segundo máximo en la expresión de Sox9 coincide con el máximo de expresión del factor de transcripción $\Delta Np63\alpha$, que no sólo participa regulando la capacidad proliferativa de las células troncales y progenitoras del epitelio (Pellegrini et al., 2001; Nylander et al., 2002; Di Iorio et al., 2005; Kawasaki et al., 2006), sino también tiene una actividad esencial para la estratificación (Truong et al., 2006; Notari et al., 2011; revisado por Guerrini et al., 2011; Zhang et al., 2015). Estos resultados sugieren que Sox9 y $\Delta Np63\alpha$ regulan el proceso de diferenciación del epitelio corneal, como se ha observado en células troncales del folículo piloso (Liu et al., 2020), y contrastan con los cambios descritos para el epitelio corneal de humano, donde la

expresión de Sox9 parece disminuir constantemente a lo largo del proceso de diferenciación sin observarse el comportamiento bifásico descrito en este trabajo. No obstante, cabe señalar que en cornea de humano no se hizo un seguimiento detallado de la expresión de Sox9 como el que realizamos (Menzel-Severing et al., 2018).

El comportamiento bifásico que Sox9 presenta en nuestro modelo experimental es similar al descrito para las poblaciones de células troncales/progenitoras y diferenciadas del epitelio intestinal (Formeister *et al.*, 2009). Esto podría sugerir que Sox9 actúa mediante vías transcripcionales distintas tanto para la proliferación como para la diferenciación, dependiendo del contexto temporal y espacial del tejido y de su relación con otros factores nucleares y elementos co-regulatorios (Xue et al., 2019; Takimoto et al., 2019; Hong y You, 2019; Wu et al., 2019).

Un aspecto de interés en este comportamiento bifásico, es la disminución en la expresión de Sox9, observada cuando los cultivos alcanzan la confluencia. Esta disminución coincide con la disminución en la expresión de Oct4 (Ortiz-Melo et al., manuscrito en preparación), así como en la expresión de componentes de la vías de señalización de Notch y Wnt (Castro-Muñozledo, resultados no publicados), y con cambios en la composición del citoesqueleto (Schermer et al., 1989; Castro-Muñozledo et al., 2017). Debemos resaltar que, durante este período, aumenta la expresión de Pax6 seguida por la expresión de la citoqueratina K3, cuyos niveles se incrementaron 24-30 horas después del aumento en Pax6, de manera similar a lo observado anteriormente (García-Villegas et al., 2009). Considerando lo anterior, es posible especular que al alcanzarse la confluencia existen cambios en la expresión genética controlados a través de mecanismos que no hemos sido capaces de distinguir. Estos cambios parecen

involucrar al grupo de factores de transcripción constituido por Pax6, Oct4, KLF4, Cux1, Six4, SP1 y Sox9 y a los complejos que participan en remodelación de la cromatina (García-Murillo, 2018). No obstante, la evidencia continúa apoyando el hecho de que Pax6 dirige la expresión del proceso de diferenciación del epitelio corneal. De nuestros experimentos surge el interés de entender la actividad de factores como Sox4, Sox11 y Sox13 cuyo patrón de expresión sugiere su participación en la regulación de células proliferativas y en células que alcanzan el estado de confluencia.

En resumen, el presente trabajo demuestra que el factor de transcripción Sox9 presenta una cinética de expresión con dos picos de aumento, uno en la fase proliferativa del cultivo y otra en la fase de estratificación. La distribución de Sox9 fue predominantemente citoplásmica con las señales nucleares concentradas en el borde proliferativo/migratorio de las colonias y en el estrato basal de los epitelios estratificados recién formados.

A futuro, los experimentos se deberán orientar a definir la función de Sox9 durante la diferenciación del epitelio corneal de mamífero. Para ello proponemos hacer estudios de co-localización de Sox9 con marcadores de proliferación como Ki67 y PCNA, y con otros factores de transcripción como Cux1, Sox4 y Sox13. Asimismo, se tiene planteado llevar a cabo el *Knock down* de Sox9 tanto en células proliferativas como en células que inician el proceso de diferenciación, y de manera mucho más específica, definir su función en cada una de las dos etapas. También llevaremos a cabo la sobreexpresión de Sox9, considerando otros factores como los anteriormente mencionados. Es de importancia definir si existe una relación funcional entre Pax6 y Sox9 ya sea mediante experimentos de interacción proteína-proteína, o como factores de transcripción que

comparten o excluyen a promotores de genes involucrados en el programa de diferenciación del epitelio corneal. En este contexto, es necesario mencionar que Pax6 se asocia a Sox2 durante la morfogénesis del cristalino (Kamachi, 2001), lo que abre la posibilidad de que Sox9 y Pax6 interactúen en procesos específicos del programa de diferenciación.

8. CONCLUSIONES.

1. Sox9 presenta una cinética bifásica en las fases de proliferación y estratificación.
2. Sox9 aumenta su expresión antes que los marcadores de fenotipo terminal Pax6 y K3, y que el marcador de células proliferativas $\Delta Np63\alpha$, y disminuye cuando las células alcanzan la confluencia.
3. Sox9 presenta su segundo pico de expresión concordante con el aumento de los marcadores de diferenciación.
4. Sox9 muestra una distribución citoplásmica predominante, mientras que la localización nuclear se expresa en los bordes migratorios o células basales.
5. El transcriptoma confirma la expresión de Sox9 en dos momentos funcionales distintos del cultivo *in vitro* de las células RCE1(5T5).

9. PERSPECTIVAS.

1. Dilucidar el papel de Sox9 en su interacción con genes que promuevan la proliferación.
2. Determinar el efecto de Sox9 sobre el programa de diferenciación del epitelio corneal de mamífero mediante estudios de pérdida o ganancia de función.
3. Determinar si la sobre-expresión o la disminución en la expresión de otras molecular reguladoras de la diferenciación o proliferación del epitelio corneal, afecta a los niveles de Sox9.
4. Analizar cuáles son las cascadas de señalización asociadas a la expresión de Sox9 y definir su función en el proceso de diferenciación del epitelio corneal.
5. Encontrar redes de interacción entre Sox9 y otros factores de transcripción que participen en la diferenciación del epitelio corneal.
6. Mapear la expresión de Sox9 *in vivo* en epitelio corneal animal, incluyendo el limbo corneal.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Adhikary, G., Crish, J. F., Gopalakrishnan, R., Bone, F. (2005). Involucrin Expression in the Corneal Epithelium : An Essential Role for Sp1 Transcription Factors. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 46(9), 3109-20.
2. Amano, S., Yamagami, S., Mimura, T., Uchida, S., & Yokoo, S. (2006). Corneal Stromal and Endothelial Cell Precursors. *Cornea*, 25(S1), S73–S77.
3. Banks, E. B., Crish, J. F., Eckert, R. L. (1999). Transcription factor Sp1 activates involucrin promoter activity in non-epithelial cell types. *Biochem J*, 337(3), 507–512.
4. Buck, R.C. (1985). Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 26(9), 1296–1299.
5. Campbell, E. (2003). Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 55(6), 761–771.
6. Carlson, BM. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo humano*. Barcelona. España. 5ª ed. Elsevier Saunders. 58-59
7. Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., Saule, S. (1993). Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell Biol.*, 13(12), 7257-7266.
8. Castro-Muñozledo, F. (1994). Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture. *J. Cell Sci*, 107 (Pt 8), 2343–2351
9. Castro-Muñozledo, F. (2013). Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Mol Vis*, 19(1600), 1600–1613.
10. Cvekl, A., Kashanchi, F., Sax, C. M., Brady, J. N., Piatigorsky, J. (1995). Transcriptional regulation of the mouse α A-crystallin gene: activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6-binding site. *Mol. Cell Biol.*, 15(2), 653-660.
11. Cvekl, A., Sax, C. M., Bresnick, E. H., Piatigorsky, J. (1994). A complex array of positive and negative elements regulates the chicken α A-crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol. Cell Biol.*, 14(11), 7363-7376.
12. Chen, T. T., Wu, R. L., Castro-Munozledo, F., Sun, T. T. (1997). Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol. Cell Biol.*, 17(6), 3056–3064.

13. Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., Hemmati-Brivanlou A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development*, 126(19), 4213-4222.
14. Chu, C. T., Plowey, E. D., Wang, Y., Patel, V., Jordan-Sciutto, K. L. (2007). Location, Location, Location: Altered Transcription Factor Trafficking in Neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66(10), 873-883.
15. Clemons, N. J., Wang, D. H., Croagh, D., Tikoo, A., Fennell, C. M., Murone, C., Scott, A. M., Watkins, D. N., Phillips, W. A. (2012). Sox9 drives columnar differentiation of esophageal squamous epithelium: a possible role in the pathogenesis of Barrett's esophagus. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 303(12), G1335-G1346.
16. Cohen-Tayar, Y., Cohen, H., Mitiagin, Y., Abravanel, Z., Levy, C., Idelson, M., Ashery-Padan, R. (2018). Pax6 regulation of Sox9 in the mouse retinal pigmented epithelium controls its timely differentiation and choroid vasculature development. *Development*, 145(15), 1-13.
17. Cotsarelis, G., Cheng, S.-Z., Dong, G., Sun, T.-T., Lavker, R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57(2), 201-209.
18. Davis, J. (2003). Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J. Cell. Sci*, 116(11), 2157–2167.
19. Davenger, M., Evensen, A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*, 229(5286), 560–561.
20. Di Iorio, E., Barbaro, V., Ruzza, A., Ponzin, D., Pellegrini, G., De Luca, M. (2005). Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(27), 9523-9528.
21. Estil, S., Primo, E.J., Wilson, G. (2000). Apoptosis in shed human corneal cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 41(11), 3360–3364.
22. Favor, J., Gloeckner, C. J., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Sandulache, R., Saule, S., Zaus, I. (2008). Relationship of Pax6 Activity Levels to the Extent of Eye Development in the Mouse, *Mus musculus*. *Genetics*, 179(3), 1345–1355.
23. Formeister, E. J., Sionas, A. L., Lorance, D. K., Barkley, C. L., Lee, G. H., Magness, S. T. (2009). Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(5), 1108–1118.
24. Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J. M., Behringer, R. R., Nakamura,

- T., Uemoto, S. (2011). Continuous Cell Supply From a Sox9-expressing Progenitor Zone in Adult Liver, Exocrine Pancreas and Intestine. *Nat Genet*, 43(1), 34-41.
25. Gallina, D., Lincoln, J. (2018). Dynamic Expression Profiles of Sox9 in Embryonic, Post Natal, and Adult Heart Valve Cell Populations. *Anat. Rec*, 302(1), 1-9.
26. García-Murillo, M. J. (2018). Análisis de la expresión de metiltransferasas de histonas y componentes de los complejos BAF (SWI/SNF) durante la diferenciación de la línea celular de epitelio corneal RCE1(5T5). Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN. México. 106 p.p.
27. García-Villegas, R., Escamilla, J., Sánchez-Guzmán, E., Pastén, A., Hernández-Quintero, M., Gómez-Flores, E., Castro-Muñozledo, F. (2009). Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J. Cell Physiol*, 220(2), 348–356.
28. Garside, V. C., Cullum, R., Alder, O., Lu, D. Y., Vander Werff, R., Bilenky, M., Zhao, Y., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Underhill, T.M., Hoodless, P. A. (2015). SOX9 modulates the expression of key transcription factors required for heart valve development. *Development*, 142(24), 4340–4350.
29. Gehring, W. J. (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells*. 1(1), 11-15.
30. Gingras, M., Larouche, K., Larouche, N., Leclerc, S., Salesse, C., Gue, S. L. (2003). Regulation of the Integrin Subunit $\alpha 5$ Gene Promoter by the Transcription Factors Sp1/Sp3 Is Influenced by the Cell Density in Rabbit Corneal Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 44(9), 3742–3755.
31. Gipson, IK. (2007). The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. The Friedenwald Lecture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 48(10), 4391-4398.
32. Glardon, S., Callaerts, P., Halder, G., Gehring, W.J. (1997). Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development*, 124(4), 817-825.
33. Gonzalez, G., Mehra, S., Wang, Y., Akiyama, H., Behringer, R. R. (2016). Sox9 overexpression in uterine epithelia induces endometrial gland hyperplasia. *Differentiation*, 92(4), 204-215.
34. Guerrini L, Costanzo A, Merlo GR. (2011). A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. *J. Biomed. Biotechnol*. 2011(2011), 1-13.
35. Halder, G., Callaerts, P., Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science*. 267(5205), 1788-1792.

36. Hanna. C., Bicknell. DS., O'Brien, JE. (1961) Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*, 65(65), 695–698.
37. Hernández-Quintero, M., García-Villegas, R., Castro-Muñozledo, F. (2002). Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*, 74(1), 71–82.
38. Hill, R. E., Davidson, D. R. (1994). Comparative development. Seeing eye to eye. *Curr Biol*. 4(12), 1155-1157.
39. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE (1971). *Histology of the Human Eye*. Co. Phila, USA. W.B. Saunders, 55-111.
40. Hong, S. H., You, J. S. (2019). SOX9 is controlled by the BRD4 inhibitor JQ1 via multiple regulation mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.*, 511(4), 746-752.
41. Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Haydon, R. C. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis*, 1(2), 149-161.
42. Kadaja, M., Keyes, B. E., Lin, M., Pasolli, H. A., Genander, M., Polak, L., Stokes, N., Zheng, D., Fuchs, E. (2014). SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors. *Genes & Development*, 28(4), 328–341.
43. Kamachi, Y. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev*, 15(10), 1272–1286.
44. Kawasaki, S., Tanioka, H., Yamasaki, K., Connon, C. J., Kinoshita, S. (2006). Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res*, 82(2), 293–299.
45. Kenyon, K.R.; Tseng, S.C.G. (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 96(5), 709-722.
46. Kitazawa, K., Hikichi, T., Nakamura, T., Sotozono, C. (2017). PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res*, 154(154), 30-38.
47. Kodama, R., Eguchi, G. (1994). Gene regulation and differentiation in vertebrate ocular tissues. *Curr Opin Genet Dev.*, 4(5), 703-708.
48. Koroma, B. M., Yang, J. M., Sundin, O. H. (1997). The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 38(1), 108–120.
49. Koster, M. I. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, 18(2), 126–131.

50. Kozmik, Z. (2005). Pax genes in eye development and evolution. *Curr Op Genetics and Dev*, 15(4), 430–438.
51. Kroeber, M., Davis, N., Holzmann, S., Kritzenberger, M., Shelah-Goraly, M., Ofri, R., Ashery-Padan, R., Tamm, E. R. (2010). Reduced expression of Pax6 in lens and cornea of mutant mice leads to failure of chamber angle development and juvenile glaucoma. *Hum. Mol. Genet.*, 19(17), 3332-3342.
52. Lavker, R.M., Tseng, S.C., Sun, T.-T. (2004). Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res*, 78(3), 433-446.
53. Lewis, P. J., Magnin, T., Errington, J. (1996). Compartmentalized distribution of the proteins controlling the prespore-specific transcription factor sigmaF of *Bacillus subtilis*. *Genes Cells*, 1(10), 881–894.
54. Li, H. S., Yang, J. M., Jacobson, R.D., Pasko, D., Sundin, O. (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev Biol.*, 162(1), 181-194.
55. Li, W., Hayashida, Y., Chen YT., Tseng SC. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.*, 17(1), 26-36.
56. Liu, J. J., Kao, W.W., Wilson, S. E. (1999). Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res.*, 68(3), 295-301.
57. Liu, F., Zhou, H., Du, W., Huang, X., Zheng, X., Zhang, C., Hu, H., Wang, J., Quan, R. (2020). Hair follicle stem cells combined with human allogeneic acellular amniotic membrane for repair of full thickness skin defects in nude mice. *J Tissue Eng Regen Med.*, 14(5), 723-735.
58. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
59. Lima Cunha, D., Arno, G., Corton, M., Moosajee, M. (2019). The Spectrum of PAX6 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in the Eye. *Genes*, 10(12),1-22.
60. Loosli, F., Kmita-Cunisse, M., Gehring, W. J. (1996). Isolation of a Pax-6 homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(7), 2658-2663.
61. Lu, L., Reinach, P.S., and Kao, W.W. (2001). Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med*, 226(7), 653-664.

62. Malki, S., Berta, P., Poulat, F., Boizetbonhoure, B. (2005). Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp. Cell Res*, 309(2), 468-475.
63. Mannis, M., Holland, E. (2017). *Cornea*. 4th edition. USA. Elsevier, 27-46.
64. Masuda, T., Wahlin, K., Wan, J., Hu, J., Maruotti, J., Yang, X., Esumi, N. (2014). Transcription Factor SOX9 Plays a Key Role in the Regulation of Visual Cycle Gene Expression in the Retinal Pigment Epithelium. *J Biol Chem*, 289(18), 12908–12921.
65. McLaughlin, B. J., Caldwell, R. B., Sasaki, Y., Wood, T. O. (1985). Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res*, 4(9), 951–962.
66. Menzel-Severing, J., Zenkel, M., Poliseti, N., Sock, E., Wegner, M., Kruse, F. E., Schlötzer-Schrehardt, U. (2018). Transcription factor profiling identifies Sox9 as regulator of proliferation and differentiation in corneal epithelial stem/progenitor cells. *Sci Rep*, 8(1), 1-18.
67. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11–24.
68. Muto, A., Iida, A., Satoh, S., Watanabe, S. (2009). The group E Sox genes Sox8 and Sox9 are regulated by Notch signaling and are required for Müller glial cell development in mouse retina. *Exp Eye Res*, 89(4), 549–558.
69. Nakamura, H., Ueda, J., Sugar, J., Yue, B. Y. J. T. (2005). Developmentally Regulated Expression of Sp1 in the Mouse Cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 46(11), 4092-4096.
70. Nishina, S., Kohsaka, S., Yamaguchi, Y., Handa, H., Kawakami, A., Fujisawa, H., Azuma, N. (1999). PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol*, 83(6), 723-727.
71. Notari, M., Hu, Y., Koch, S., Lu, M., Ratnayaka, I., Zhong, S., Baer, C., Pagotto, A., Goldin, R., Salter, V., Candi, E., Melino, G., Lu, X. (2011). Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(40), 16645-16650.
72. Nylander, K., Vojtesek, B., Nenutil, R., Lindgren, B., Roos, G., Zhanxiang, W., Coates, P. J. (2002). Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J. Pathol*, 198(4), 417-427.

73. Parfitt, G. J., Kavianpour, B., Wu, K. L., Xie, Y., Brown, D. J., Jester, J. V. (2015). Immunofluorescence tomography of mouse ocular surface epithelial stem cells and their niche microenvironment. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 56(12), 7338–7344.
74. Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., De Luca, M. (2001). P63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(6), 3156-3161.
75. Pritchett, J., Athwal, V., Roberts, N., Hanley, N. A., Hanley, K. P. (2011). Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: Lessons from development. *Trends Mol Med*, 17(3), 166–174.
76. Purba, T. S., Haslam, I. S., Shahmalak, A., Bhogal, R. K., & Paus, R. (2015). Mapping the expression of epithelial hair follicle stem cell-related transcription factors LHX2 and SOX9 in the human hair follicle. *Exp. Dermatol*, 24(6), 462–467
77. Regatieri, CVS., Roh, S., Weiter, J.J. (2014). Retinal and choroidal circulation. In: *Ophthalmology*. 4th ed. (Yanoff M, Duker JS, eds). Philadelphia, PA Elsevier Saunders, Chapter 6.3.
78. Robertson, D. M., Ho, S.-I., Cavanagh, H. D. (2008). Characterization of Δ Np63 isoforms in normal cornea and telomerase-immortalized human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*, 86(4), 576-585.
79. Ross, M. H., Pawlina, W. (2017). *Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 7th edition. Baltimore, MD. Lippincott Williams & Wilkins, 900-907.
80. Sartaj, R., Zhang, C., Wan, P., Pasha, Z., Guaiquil, V., Liu, A., Liu, J., Luo, Y., Fuchs, E., Rosenblatt, M. I. (2017). Characterization of slow cycling corneal limbal epithelial cells identifies putative stem cell markers. *Sci Rep*, 7(1), 3793.
81. Sasamoto, Y., Hayashi, R., Park, S. J., Saito-Adachi, M., Suzuki, Y., Kawasaki, S., Nishida, K. (2016). PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep*, 6(1), 20807.
82. 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(1), 49-62.
83. Schermer, A., Jester, J. V., Hardy, C., Milano, D., Sun, T. T. (1989). Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation*. 42(2), 103-110.
84. Schubert, H.D. (2014). Structure of the neural retina. In: *Ophthalmology*. 4th ed. (Yanoff M, Duker JS, eds). Philadelphia, PA Elsevier Saunders, Chapter 6.1.

85. Secker, GA., Daniels, JT. (2008). Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem Cell Rev*, 4(3), 159–168.
86. Shaham, O., Menuchin, Y., Farhy, C., Ashery-Padan, R. (2012). Pax6: A multi-level regulator of ocular development. *Prog Retinal Eye Res*, 31(5), 351–376.
87. Shi, G., Sohn, K.-C., Li, Z., Choi, D.-K., Park, Y. M., Kim, J.-H., Fan, Y.M., Nam, Y.H., Kim, S., Im, Myung., Lee, Y., Seo, Y.J., Kim, S.D., Lee, J.-H. (2013). Expression and Functional Role of Sox9 in Human Epidermal Keratinocytes. *PLoS ONE*, 8(1), 1-9.
88. Shiraishi, A., Converse, R. L., Liu, C. Y., Zhou, F., Kao, C. W., Kao, W. W. (1998). Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39(13), 2554-2561.
89. Suzuki, K., Saito, J., Yanai, R., Yamada, N., Chikama, T., Seki, K., Nishida, T. (2003). Cell–matrix and cell–cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Retinal Eye Res*, 22(2), 113-133.
90. Swamynathan, S. K. (2013). Ocular surface development and gene expression. *J Ophthalmol*, 2013(2013), 1-22.
91. Takács, L., Tóth, E., Losonczy, G., Szanto, A., Bähr-Ivacevic, T., Benes, V., Berta, A., Vereb, G. (2011). Differentially Expressed Genes Associated with Human Limbal Epithelial Phenotypes: New Molecules That Potentially Facilitate Selection of Stem Cell-Enriched Populations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 52(3), 1252-1260.
92. Takimoto, A., Kokubu, C., Watanabe, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Kondoh, G., Hiraki, Y., Shukunami, C. (2019). Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven transactivation. *Sci Rep*. 9(1), 1-16.
93. Tempest, N., Baker, A. M., Wright, N. A., Hapangama, D. K. (2018) Does human endometrial LGR5 gene expression suggest the existence of another hormonally regulated epithelial stem cell niche? *Hum Reprod*, 33(6), 1052-1062.
94. Thoft R.A., Friend, J. (1983) The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 24(10), 1442-1443.
95. Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W., Piatigorsky, J. (1997). Squid Pax-6 and eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(6), 2421-2426.
96. Truong, A. B., Kretz, M., Ridky, T. W., Kimmel, R., & Khavari, P. A. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev*, 20(22), 3185–3197.

97. Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Lamb, N., Fernandez, A. (1996). Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem Sci*, 21(2), 59–64.
98. Wang, C., Zhang, M., Guo, H., Yan, J., Liu, F., Chen, J., Li, Y., Ren, F. (2019). Human Milk Oligosaccharides Protect against Necrotizing Enterocolitis by Inhibiting Intestinal Damage via Increasing the Proliferation of Crypt Cells. *Mol Nutr Food Res*. 63(18), 1-12.
99. Wang, D.-Y., Cheng, C.-C., Kao, M.-H., Hsueh, Y.-J., Ma, D. H. K., & Chen, J.-K. (2005). Regulation of Limbal Keratinocyte Proliferation and Differentiation by TAP63 and Δ Np63 Transcription Factors. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, 46(9), 3102-3108.
100. Wu, H., He, Y., Chen, H., Liu, Y., Wei, B., Chen, G., Lin, H., Lin, H. (2019). LncRNA THOR increases osteosarcoma cell stemness and migration by enhancing SOX9 mRNA stability. *FEBS Open Bio.*, 9(4), 781-790
101. Wu, R.L., Zhu, G., Galvin, S., Xu, C., Haseba, T., Chaloin-Dufau, C., Dhouailly, D., Wei, Z.G., Lavker, R.M., Kao, W.-Y., Sun, T.-T. (1994). Lineage-specific and differentiation-dependent expression of K12 keratin in rabbit corneal/limbal epithelial cells: cDNA cloning and northern blot analysis. *Differentiation*, 55(2), 137-144.
102. Xue, Y., Lian, W., Zhi, J., Yang, W., Li, Q., Guo, X., Gao, J., Qu, H., Lin, W., Li, Z., Lai, L., Wang, Q. (2019). HDAC5-mediated deacetylation and nuclear localisation of SOX9 is critical for tamoxifen resistance in breast cancer. *Br J Cancer*. 121(12,) 1039-1049.
103. Yang, K., Jiang, Z., Wang, D., Lian, X., Yang, T. 2009. Corneal epithelial-like transdifferentiation of hair follicle stem cells is mediated by pax6 and beta-catenin/Lef-1. *Cell Biol. Int.*, 33(8), 861-866.
104. Zhang, W., Cveklova, K., Opperman, B., Kantorow, M., Cvekl, A. (2001). Quantification of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis*, 7(7), 1-5.
105. Zhang, Y., Yeh, L.-K., Zhang, S., Call, M., Yuan, Y., Yasunaga, M., Liu, C.-Y. (2015). Wnt/ β -catenin signaling modulates corneal epithelium stratification via inhibition of Bmp4 during mouse development. *Development*, 142(19), 3383-3393.