

Caracterización fenotípica de células epiteliales limbales humanas expandidas *in vitro*

Gabriel Andrés Luna-Baca, Yonathan Garfias, Atzin Robles-Contreras y María Carmen Jiménez-Martínez*

Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 30 de enero de 2007

Aceptado: 9 de febrero de 2007

RESUMEN

Introducción: Las células epiteliales limbales humanas (CELhu) han sido utilizadas en la clínica para promover la rápida re-epitelización en enfermedades de la superficie ocular con la finalidad de restaurar la integridad del epitelio corneal. Sin embargo, esta técnica aún no ha sido desarrollada en nuestro país. El objetivo de este estudio fue desarrollar una técnica de cultivo de CELhu *in vitro* y caracterizar su fenotipo.

Material y métodos: Las células fueron obtenidas de tejido limbal, cultivadas en medio KSMF y analizadas para la expresión de vimentina, K, K19, p63 y K12 por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Resultados: El fenotipo de las células cultivadas fue vimentina⁺K⁺K19⁺p63⁺K12⁻.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que bajo estas condiciones de cultivo, las CELhu mantuvieron el fenotipo de célula pluripotencial. Esta técnica de cultivo podría ser utilizada con propósitos clínicos en nuestro país.

Palabras clave:

Células epiteliales limbales humanas, cultivo celular, fenotipo

SUMMARY

Introduction: Human limbal epithelial cells (huLEC) have been used for clinical purposes in ocular surface diseases to promote rapid re-epithelisation and restore corneal epithelium integrity. However, in Mexico this technique has not been fully developed. This study was conducted to characterize the huLEC phenotype expanded *in vitro* using a cell culture technique.

Material and methods: Cells were obtained from limbal tissue, cultured in KSMF medium and analyzed for the expression of vimentin, K, K19, p63, K12, by flow cytometry and immunofluorescence.

Results: The phenotype of cultured cells was vimentin⁺K⁺K19⁺p63⁺K12⁻.

Conclusions: Our results suggest that under these culture conditions huLEC maintained their stem cell phenotype. This culture technique could be used for clinical purposes in Mexico.

Keywords:

Human limbal epithelial cells, cell culture, phenotype

Introducción

El epitelio corneal tiene la capacidad de regenerarse rápidamente gracias a las células epiteliales limbales (CEL). La homeostasis de las CEL es necesaria para la integridad de la superficie ocular y por lo tanto la función visual. En condiciones fisiológicas y después de una lesión, el mantenimiento del contenido celular es logrado por esta población de células madre pluripotenciales localizadas en el epitelio basal del limbo esclerocorneal.¹⁻³

Por definición, una célula progenitora pluripotencial es una célula capaz de dividirse progresivamente, dando origen a una progenie y continuando un proceso de diferenciación. De esta forma, las células lesionadas o senescentes son continuamente reemplazadas por células nuevas, manteniendo así una población celular constante.⁴⁻⁶ Las CEL constituyen la fuente primaria del epitelio corneal y se caracterizan

por tener la capacidad de autorrenovación, originando otras células llamadas "células amplificadas en tránsito",⁷ que, a su vez, se diferencian en las células del epitelio anterior corneal.⁸⁻¹³

El mantenimiento epitelial corneal a través de dichas células y su respuesta a la lesión ha permitido cambiar el abordaje terapéutico en el manejo de las enfermedades corneales.⁵ El aporte insuficiente o la ausencia de CEL provocan alteraciones en la reparación epitelial corneal, trayendo como resultado defectos epiteliales persistentes, neovascularización, cicatrización, ulceración o una probable perforación corneal.^{14,15} Es por eso que en países desarrollados las células epiteliales limbales humanas (CELhu) han sido expandidas *in vitro* para su uso posterior en el tratamiento de lesiones corneales, observándose regresión de la vascularización y de la inflamación con mejoría en la transparencia óptica.^{3,16-21} Desgraciadamente esta técnica no

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. María Carmen Jiménez-Martínez. Unidad de Investigación, 4º Piso, Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, Chimalpopoca 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, 06800 México D.F. Tel.: (52 55) 5588-4600, ext. 3212. Correo electrónico: jmaricarmen@yahoo.com

está disponible en la mayoría de los países en desarrollo, incluyendo nuestro país. No obstante, hoy en día estamos alcanzando algunos logros en México con la introducción del manejo de las CELhu *in vitro*. Una de las mayores limitantes en el cultivo de las CELhu es su transdiferenciación a células mioepiteliales y/o miofibroblastos.²² De ahí surge la importancia en la caracterización fenotípica por medio de marcadores moleculares específicos como citoqueratina 19 (K19) y p63, entre otros ya que el mantenimiento de las características fenotípicas garantiza su actividad biológica y terapéutica permitiendo una continua reparación del epitelio corneal.²³⁻²⁵

El objetivo de este estudio fue caracterizar el fenotipo de las CELhu por una técnica de cultivo celular *in vitro* desarrollada en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

Material y métodos

Material y reactivos

Placas de cultivo celular (Costar, Corning, NY, USA); tubos cónicos de 1.5ml (Eppendorf, Hamburg, Germany); medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium), KFSM (keratocyte serum free medium), suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA); anfotericina B, gentamicina, azul tripano, tripsina/EDTA (Sigma, St. Louis Missouri, USA); Dispasa II (Roche, Mannheim, Germany); anticuerpos monoclonales: anticuerpo universal conjugado a biotina, anti-citoqueratina (K) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), anti-citoqueratina 12 (K12), anti-citoqueratina 19 (K19), anti-vimentina, anti-p63 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), conjugado a estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC), sales para preparar PBS (Phosphate Buffered Saline), Tween (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate) (Sigma, St. Louis Missouri, USA); microscopio invertido, microscopio óptico, microscopio con fuente de luz ultravioleta (Olympus, Japan); centrífuga (Zentrifugen, Germany); porta-objetos (Corning, México), cubre-objetos, incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA); cámara de Neubauer (Bright Line, Buffalo, NY, USA); citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA).

Tejido limbal corneal

Se utilizaron tejidos limbo-corneales de donador cadavérico, obtenidos del banco de ojos del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana-Cruz Roja, México, D.F. Los tejidos estuvieron conservados en Optisol™-GS (Bausch and Lomb Inc, Rochester, NY, USA) a 4°C hasta ser procesados para cultivo.

Cultivo primario de CELhu

Las células fueron obtenidas a partir de tejido limbo-corneal, el cual fue colocado en esferas de goma transparentes de 3.5 cm de diámetro para su disección. Después de remover con un bisturí los restos de iris y el exceso de esclera, el borde limbal restante fue cortado por la mitad. Ambos fragmentos fueron

colocados en dispasa 1:2 en PBS. Se incubaron por 45 minutos a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂ y 95 % de humedad. Posteriormente se realizó un segundo corte dejando fragmentos de 4 × 4 mm². Cada uno de los fragmentos se posicionó con el borde epitelial hacia abajo dentro de una placa para cultivo celular de 24 pozos (pozo/fragmento) y cubiertos con 25 µl de suero fetal bovino durante 24 horas. Después de este tiempo, se adicionó a cada pozo con 500 µl de medio KFSM enriquecido con extracto de pituitaria (4.5 µl/ml), EGF humano (0.14 µl/ml), Insulina (5 µl/ml), hidrocortisona (0.05 µl/ml), gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina B (1.25 µg/ml). Posteriormente los fragmentos de tejido fueron cultivados a 37°C en las condiciones de atmósfera y humedad ya mencionadas. El medio fue cambiado cada dos o tres días.

Obtención de células cultivadas

Se utilizó tripsina-EDTA 0.25/0.03 % durante 10 minutos vigilando la disgregación celular con microscopio invertido. Posteriormente la reacción enzimática se detuvo con suero fetal bovino a 10%, las células fueron recolectadas y contadas en la cámara de Neubauer determinando viabilidad celular con azul tripano a 0.1%.

Citometría de flujo

Las células obtenidas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo. Se realizaron incubaciones con anticuerpos dirigidos contra K, K12, K19, vimentina y p63 en células permeabilizadas con saponina, siguiendo la metodología descrita por Jiménez-Martínez et al.²⁶ Se adquirieron 5000 eventos por duplicado en un citómetro de flujo evaluando las características fenotípicas en una ventana de tamaño vs. granularidad celular, presentando los resultados en imágenes dot-plot (Software CELLQUEST[®]).



Figura 1. Tejido limbal corneal. Se muestra el frasco con el tejido limbal corneal mantenido en conservación, previo a su proceso *in vitro*.

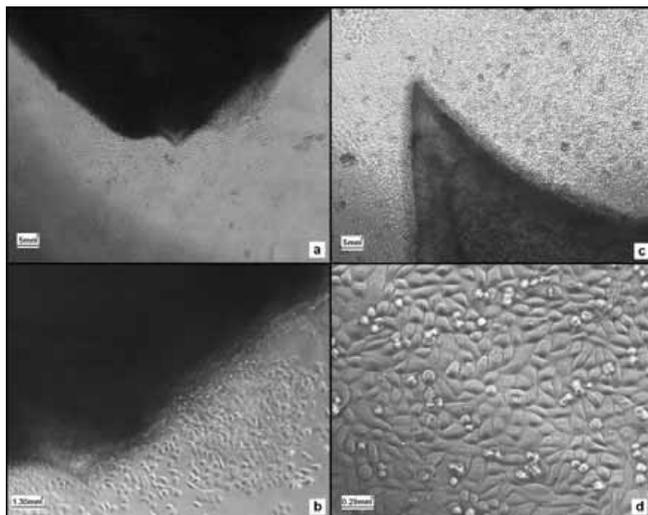


Figura 2. Microscopia de contraste de fase de las células cultivadas *in vitro*. Se observa en (a) y (b) células migrando desde el tejido limbal después de 5 días de cultivo a 40x (a) y a 100x (b). En (c) y (d), las células alcanzan confluencia a los 15 días de cultivo a 40x (c) y a 200x (d).

Inmunofluorescencia

Las células fueron obtenidas por la técnica de tripsina previamente descrita. Se colocaron 2×10^4 células sobre cubreobjetos redondos (1 cm. de diámetro) dentro de una placa de cultivo y cubiertas con 500 μ l. de KSFM durante 24 horas. Luego se retiró el sobrenadante y las células fueron fijadas con etanol 70 % durante 15 minutos. A continuación se lavó dos veces con PBS-Tween 0.05% y se incubó con el anticuerpo primario a 4° C durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, se procedió a la segunda incubación con un anticuerpo secundario universal conjugado a biotina con la misma metodología. Por último, una tercera incubación se llevó a

cabo con estreptavidina-FITC y, finalmente, las células fueron observadas en el microscopio de campo oscuro y luz UV.

Resultados

Tiempo de crecimiento celular

Las células fueron obtenidas a partir de tejido limbo-corneal, conservado hasta 15 días post mortem (Figura 1). El tiempo promedio para la expansión celular fue de 15 días. El crecimiento celular fue dependiente de la frescura del tejido y del tiempo entre la muerte del donador y el inicio del cultivo celular. La expansión de las células fue evaluada por microscopio invertido. Las células epiteliales migraron desde el tejido limbal aproximadamente a los $5 \pm 2.8^{3-7}$ días (Figuras 2a y 2b) alcanzando confluencia en $15 \pm 1.4^{14-16}$ días (Figura 2c) y presentando una morfología clásica de células epiteliales (Figura 2d). Al analizar la confluencia celular se observó que en un área de 0.29 mm² a 200x se cuantificaron 302 células con un tamaño promedio de 45 μ m. (Figuras 3a y 3b).

Características fenotípicas de las células cultivadas *in vitro*

El fenotipo de las células cultivadas *in vitro* fue evaluado por citometría de flujo e inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas características de células epiteliales limbales. En este estudio se analizaron 5 marcadores: K, vimentina, p63, K19 y K12. La expresión de K fue de 98 % (Figura 4b), vimentina 99% (Figura 4c), p63 80 % (Figura 4d), K19 95 % (Figura 4e). El promedio y la desviación estándar de los diferentes marcadores analizados se resumen en el cuadro I. Para corroborar los datos obtenidos en la citometría se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Figuras 5a y 5b) eligiendo los marcadores principales de células epiteliales limbales (K19, p63).²³⁻²⁵ Con esta técnica se confirmó la característica fenotípica de

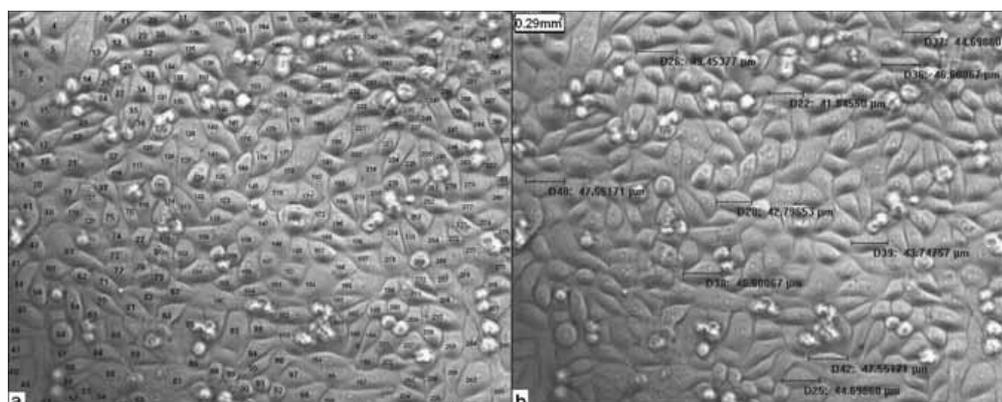


Figura 3. Características de las células en cultivo. En (a), se observan 302 células en un área de 0.29 mm² con un tamaño promedio de 45 μ m. En (b), 200x.

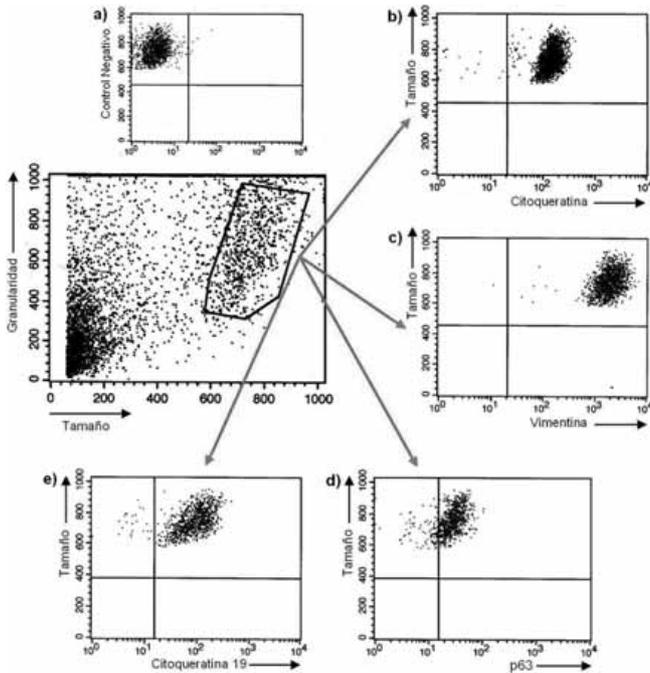


Figura 4. Citometría de flujo de las células postcultivo. Las células fueron marcadas con anticuerpos fluorescentes, como se describió en Material y Métodos y se realizó el análisis por granularidad y tamaño celular. a) Control de isotipo; b) Citoqueratina; c) Vimentina; d) p63; e) Citoqueratina 19.

célula pluripotencial limbal ya que no se detectó la presencia de K12 (Figura 5a).¹

Discusión

En los últimos años, las células epiteliales limbales humanas (CELhu) han sido utilizadas en la clínica para promover la rápida re-epitelización en enfermedades de la superficie ocular con la finalidad de restaurar la integridad del epitelio corneal.¹⁶⁻²¹ De aquí la importancia de comenzar a trabajar con CELhu en nuestro país, desarrollando una técnica de cultivo celular *in vitro* que permita en un futuro su aplicación clínica.

En este estudio, evaluamos en primer lugar el tiempo promedio de crecimiento y migración celular desde el tejido

Cuadro I. Características fenotípicas de las células cultivadas *in vitro*

Marcadores	Células positivas % (promedio ± DE)
Citoqueratina	98.03 ± 1.1
Vimentina	99.81 ± 0.16
Citoqueratina 19	95.50 ± 2.6
p63	80.03 ± 10.9

DE = desviación estándar.

limbo-corneal. Observamos que el crecimiento celular promedio empezó a los cinco días y la confluencia celular (congregación) a los 15 días. La expansión celular dependió del tiempo en que ocurrió la muerte del donador y el inicio del cultivo celular. Otros autores han reportado que la conservación prolongada del tejido hace que disminuya la expansión celular en los cultivos y prolongue el tiempo inicial de crecimiento.²³

Después, se evaluó el fenotipo de las células cultivadas *in vitro*. Para lo anterior, se utilizó citometría de flujo e inmunofluorescencia encontrando que más de 90% de las células cultivadas tenían el fenotipo vimentina+citoqueratina+K19+p63+K12, como se ha reportado en la literatura.²³⁻²⁵ La vimentina se encuentra presente en las células indiferenciadas, se expresa junto con la desmina en etapas tempranas del desarrollo celular y su expresión ha sido asociada con las células pluripotenciales corneales. Se sabe que las citoqueratinas se expresan en el tejido epitelial y juegan un papel crítico en la diferenciación del tejido epitelial manteniendo su integridad estructural.^{24,27} K19 es una citoqueratina expresada predominantemente por las células epiteliales limbales que junto con p63, una proteína

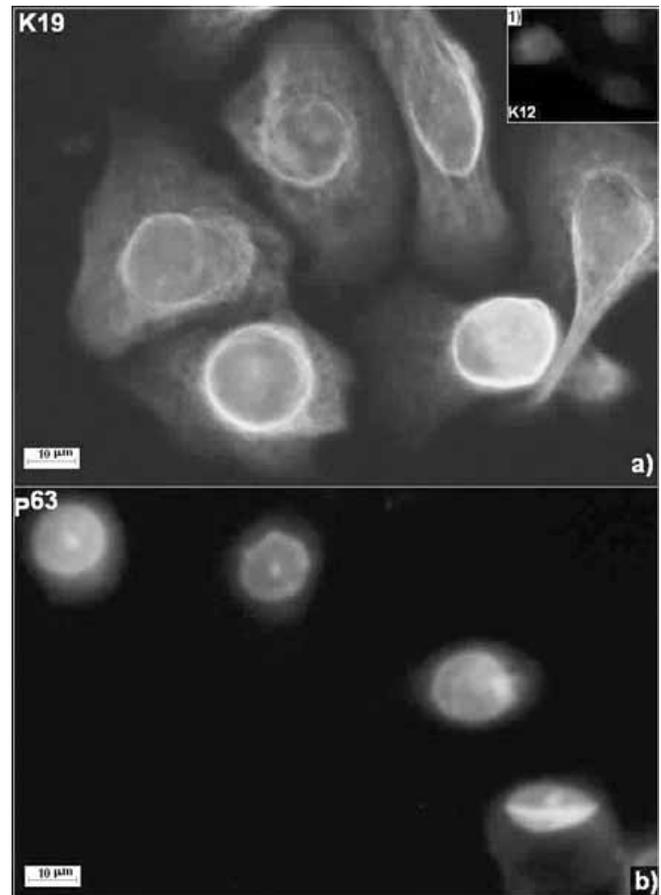


Figura 5. Inmunofluorescencia de las células postcultivo. a) K19 en el citoplasma celular y en el recuadro superior derecho tinción negativa para K12. b) Tinción con p63 en el núcleo celular. 400x.

nuclear han sido reconocidas como marcadores fenotípicos para células progenitoras de queratinocitos, incluyendo a las CEL.^{24,25} Otra característica fenotípica de las CEL es la ausencia de los marcadores K3, K12 y conexina 43, ya que sólo se expresan en las células epiteliales corneales diferenciadas.²⁴ La caracterización fenotípica de las células cultivadas coincide con otros estudios lo que sugiere que estas células mantienen sus características de célula epitelial limbal a lo largo del cultivo;^{24,25} debido a que una de las mayores limitantes en el cultivo de las CEL es su transdiferenciación a células mioepiteliales y/o miofibroblastos.²² Por lo tanto, es necesario identificar su fenotipo por medio de los marcadores antes mencionados a fin de garantizar la conservación de sus características de célula madre pluripotencial.

En conclusión, la técnica de cultivos celulares *in vitro* desarrollada en nuestro laboratorio garantiza la obtención de células epiteliales limbales humanas que mantengan sus características fenotípicas. Esto nos asegura que se conserve su actividad biológica y terapéutica abriendo la posibilidad de su aplicación clínica a corto plazo en nuestro país.

Agradecimientos

Agradecemos a la señora Verónica Romero Martínez por su apoyo técnico para la realización de este trabajo de investigación. Fuentes del financiamiento de la investigación: este trabajo fue apoyado parcialmente por los proyectos CONACYT-SALUD 2004-01-096 y SALUD 2005-14-108.

Referencias

1. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229:560-561.
2. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
3. Tseng SC. Concept and application of Limbal stem cells. *Eye* 1989; 3:141-157.
4. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-1020.
5. Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:643-657.
6. Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ. Limbal Stem Cells: The search for a marker, *Clin Experiment Ophthalmol* 2006; 34:64-73.
7. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998;111:2867-2875.
8. Kruse FE, Volcker HE. Stem cells, wound healing, growth factors and angiogenesis in the cornea. *Curr Opin Ophthalmol* 1997;8:46-54.
9. Dua HS, Azuaro-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415-425.
10. Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep* 2001;21:385-405.
11. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78:433-446.
12. Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, presence, and future. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004;9:202-207.
13. Charukamnoetkanok P. Corneal stem cells: bridging the knowledge gap. *Semin Ophthalmol* 2006;21:1-7.
14. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997;41:275-313.
15. Chiou AG, Florakis GJ, Kasim M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular dysfunction. *Surv Ophthalmol* 1998;43:19-46.
16. Pellegrini G, Traverso CE, Franz AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated epithelium. *Lancet* 1997;349:990-993.
17. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145:769-782.
18. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine* 1999;340:1697-1703.
19. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *New England Journal of Medicine* 2000;343:86-93.
20. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-1574.
21. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119:298-300.
22. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003;77:581-592.
23. Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded *ex vivo* from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res* 2004;79:41-49.
24. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of Limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81:247-264.
25. Wolosin JM. Cell markers and the side population phenotype in ocular surface epithelial stem cell characterization and isolation. *Ocul Surf* 2006;4:10-23.
26. Jimenez-Martinez MC, Mejia H, Linares M, Santacruz C, Sanchez-Navarro A, Suarez R, Garfias Y. Intracellular expression of interleukin-4 and interferon-gamma by a mycobacterium tuberculosis antigen-stimulated CD4+ CD57+ T-cell subpopulation with memory phenotype in tuberculosis patients. *Immunology* 2004;111:100-106.
27. van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Cytokeratin expression in normal and (pre) malignant head and neck epithelia: overview. *Head Neck* 1993;15:133-146.

FE DE ERRATA

En el artículo "Síndrome del espectro autista. Importancia del diagnóstico temprano", de Agenor Limon, publicado en el número 1 del presente año, al final del cuadro número 1 dice:

"* Indica las preguntas críticas más indicativas de la existencia de rasgos autistas. La respuesta **Sí** a dos o más puntos en cada sección es un indicativo de alto riesgo de SEA." debe decir:

"* Indica las preguntas críticas más indicativas de la existencia de rasgos autistas. La respuesta **No** a dos o más puntos en cada sección es un indicativo de alto riesgo de SEA."