



## OPTIMIZACIÓN DE LA EXPANSIÓN *IN VITRO* DE CELULAS TRONCALES EPITELIALES LIMBALES MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS COMO MATRIZ EXTRACELULAR

Mario Antonio Tellez-González.\*; Pilar Hazel Carranza Castro \*\*; Paul Mondragón-Terán\*.

\*Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, \*\*Servicio de Cirugía Experimental; Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE. México D.F. C.P. 03100. [p.mondragonteran@gmail.com](mailto:p.mondragonteran@gmail.com)

*Palabras clave: Células troncales epiteliales limbales, expansión, matriz extracelular.*

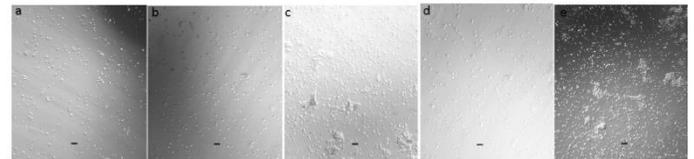
**Introducción.** Se ha reportado que una población de células troncales (CT), conocida como Células Troncales Epiteliales Limbales (CTEL) son las responsables de la regeneración del epitelio corneal, en respuesta al desgaste normal y posterior a alguna lesión<sup>1</sup>. La deficiencia de CTEL es caracterizada por la vascularización corneal<sup>2</sup>, consecuencia de una deficiente salud ocular derivada por daño físico, químico o por diversas enfermedades<sup>3</sup>. Existen 17 reportes de terapia celular para revertir la deficiencia de CTEL, algunos utilizan co-cultivo de CTEL con células de fibroblasto de ratón embrionario '3T3', otros emplean membrana amniótica como soporte directo para el cultivo de CTEL<sup>4</sup>. Uno de los mayores retos que enfrenta el cultivo CTEL es su óptima derivación y expansión en medios de cultivo químicamente definidos; donde la finalidad es generar una cantidad suficiente de células con el fenotipo y genotipo correcto, así como erradicar a las células que comprometen la seguridad y eficacia del tratamiento.

**Objetivo:** Investigar el uso de diferentes proteínas (Laminina, Fibronectina y Colágeno tipo I y IV) como matriz extracelular durante la expansión de CTEL.

**Metodología:** Extracción de rodetes esclero-corneales: A través de técnica quirúrgica, se obtuvieron rodetes esclerocorneales, de conejos machos adultos de la cepa Nueva Zelanda, con peso promedio de  $1,500 \pm 200$  gramos. La eutanasia se llevó a cabo por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico en una dosis de 90 mg/kg de peso corporal; la extracción se realizó cuando el animal se encontraba bajo anestesia general. Aislamiento y cultivo de las CTEL. Los rodetes se trataron con 2.5 mL de Dispasa durante 2 h a 37°C; seguido de una separación mecánica. El extracto fue centrifugado a 800 rpm durante 5 min. a 4°C; finalmente el pellet se resuspendió en Medio Epilife<sub>10</sub> adicionado con HCGS. Las células fueron cultivadas en cajas multiposillos previamente tratadas con la proteína base a investigar (Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I y Colágeno tipo IV), utilizando una concentración de  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para todos los casos; la ausencia de proteína base se incluyó como control. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas.

La expansión celular se realizó en condiciones de cultivo estándar (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Inmunocitoquímica. Se identificó la presencia de los anticuerpos primarios Citoqueratina 3 y P63- $\alpha$  (marcadores para las células epiteliales y CTEL respectivamente). El núcleo se identificó por incubación de las muestras con DAPI (300mM). Evaluación de la expansión celular. Se realizó conteo celular manual, identificando a las CTEL (P63- $\alpha$ +) y a las células epiteliales (CK3+).

### Resultados.



**Fig.1.** Microfotografías a 0h de cultivo. Se observa el fenotipo circular y con núcleo grande, característico de las CTEL en las diferentes matrices extracelulares. a) Control b) Fibronectina c) Laminina d) Colágeno tipo I e) Colágeno tipo IV. Escala 70  $\mu\text{m}$ .



**Fig.2.** Microfotografías a 230h de cultivo en Fibronectina. De izquierda a derecha: Campo claro, CTEL positivas para p63 $\alpha$ -Alexa Fluor 488.

**Conclusiones.** Fibronectina es la proteína que optimiza la expansión de las CTEL, además evita la diferenciación hacia células epiteliales.

**Agradecimiento.** Trabajo financiado por el Programa E015 – Investigación Científica y Tecnológica - ISSSTE.; a la MC Rebeca Pérez del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo técnico con el microscopio de epifluorescencia.

### Bibliografía.

1. Thoft R., Friend J. (1983). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24 (10): 1442-1443.
2. Schlötzer U., Kruse F. (2005). *Experimental Eye Research.* 81 (3): 247-264.
3. Daniels J., Harris A., Mason C. (2006). *Stem Cell Reviews.* 6 (3): 247-254.
4. Shortt A., Secker G., Rajan M., Meligonis G., Dart J., Tuft S., Daniels J. (2008). *Ophthalmology.* 115 (11): 1899-1997.