



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

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 lesión¹. La deficiencia de CTEL es caracterizada por la vascularización corneal², consecuencia de una deficiente salud ocular derivada por daño físico, químico o por diversas enfermedades³. 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 CTEL⁴. 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 Epilife₁₀ 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 CO₂). Inmunocitoquímica. Se identificó la presencia de los anticuerpos primarios Citoqueratina 3 y P63- α (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- α +) y a las células epiteliales (CK3+).

Resultados.

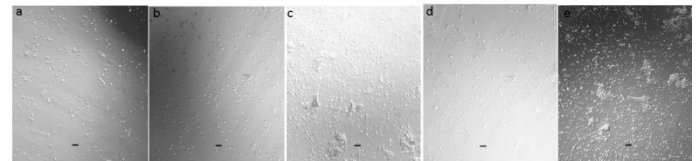


Fig.1. Microfotografías a 0h de cultivo. Se observa el fenotipo circular y con núcleo grande, característico de las CTEL en las diferentes matrices extracelulares. a) Control b) Fibronectina c) Laminina d) Colágeno tipo I e) Colágeno tipo IV. Escala 70 μm .



Fig.2. Microfotografías a 230h de cultivo en Fibronectina. De izquierda a derecha: Campo claro, CTEL positivas para p63 α -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.