

Estrategias de regeneración de la córnea con células troncales epiteliales limbares

Téllez-González MA¹, Gutiérrez-Salinas J², Suárez-Cuenca JA³, Mondragón-Terán P¹

Resumen

Las células troncales epiteliales limbares son células unipotentes que se localizan en el limbo esclerocorneal. En las últimas décadas se ha demostrado que estas células tienen un papel importante en el mantenimiento y renovación de la córnea. Su ausencia en este tejido llega a generar complicaciones como la pérdida de transparencia, insuficiencia regenerativa e incluso distintos síndromes. Su derivación y cultivo *in vitro* es una estrategia potencial en *Medicina regenerativa*; una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas para generar su cultivo en 3D se puede realizar experimentación traslacional en forma de pruebas clínicas, mismas que podrán proveer soluciones a distintos problemas visuales.

PALABRAS CLAVE: células troncales epiteliales limbares, córnea, medicina regenerativa, ingeniería de tejidos.

Rev Esp Méd Quir. 2016 Jan;21(1):24-30.

Strategies for regeneration of corneal limbal epithelial stem cells

Téllez-González MA¹, Gutiérrez-Salinas J², Suárez-Cuenca JA³, Mondragón-Terán P¹

Abstract

The Limbal Epithelial Stem Cells (LESC's) are unipotent Stem Cells that reside in the esclero-corneal limbus. Since the last decade it has been reported that these cells play an important role in the maintenance and regeneration of the cornea. The absence of these cells, derive in complications in the corneal tissue such as losing transparency, regenerative failure, including the presence of syndromes. The culture and derivation of LESC's is a potential strategy for regenerative medicine: Once the optimal experimental conditions to generate a 3D LESC culture is established, these 3D constructs could be used as corneal substitutes in clinical trials.

KEYWORDS: Limbal epithelial stem cells; Cornea; Regenerative medicine; Tissue engineering

¹Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos.

²Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental.

³Laboratorio de Metabolismo Experimental e Investigación Clínica.

División de Investigación Biomédica; Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. San Lorenzo 502, 3er. piso. Col. Del Valle; Del. Benito Juárez, 03100 Ciudad de México.

Recibido: 16 de noviembre 2015

Aceptado: 10 de febrero 2016

Correspondencia

Dr. Paul Mondragón Terán

Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos

División de Investigación Biomédica
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre

San Lorenzo 502 3er. piso

CP 03100, Ciudad de México

p.mondragonteran@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Téllez-González MA, Gutiérrez-Salinas J, Suárez-Cuenca JA, Mondragón-Terán P. Estrategias de regeneración de la córnea con células troncales epiteliales limbares. Rev Esp Med Quir. 2016;21(1): 24-30.

CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales se han definido como células indiferenciadas capaces de autorreplicarse, proliferar y con un potencial de diferenciación a distintos tipos de células especializadas; no sólo morfológicamente sino también de forma funcional. Su aislamiento y caracterización significan un reto metodológico ya que se debe comprobar que una célula es troncal mediante la manipulación *in vitro* pudiendo resultar en la alteración de alguna de sus propiedades.¹

Una célula troncal puede tener una división simétrica o asimétrica. En la simétrica las dos células hijas son similares a la progenitora y en la asimétrica una de las dos células hijas conserva la totalidad de las características biológicas (troncalidad) de la célula original y la otra las pierde iniciando un proceso de diferenciación o especialización, produciendo proteínas requeridas para su propia función dentro del tejido u órgano del cual formará parte. Si se realiza un balance entre las divisiones simétricas y asimétricas las células troncales son las únicas con la capacidad de mantener su progenie en la misma cantidad.²

Dependiendo de la ubicación al momento de su extracción las células troncales se dividen conceptualmente en dos tipos: células troncales embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cell*) y células troncales adultas o somáticas. Las células troncales embrionarias se encuentran en la masa celular interna del blastocisto y son capaces de formar un embrión; mientras que las células troncales somáticas se encuentran en tejidos posnatales.³

Clasificación de las células troncales

Se clasifican dependiendo a su potencial de diferenciación de acuerdo con el orden jerárquico del desarrollo embrionario manifestándose en el ámbito natural.⁴ Se dice que una célula troncal

muestra mayor *potencialidad* cuando se pueden obtener una cantidad diversa de líneas celulares *in vitro* o *in vivo* y que posee menor *potencialidad* cuando muestra diferenciación hacia un reducido número de líneas celulares.⁵

Conforme con esto las células troncales se clasifican por su potencialidad; a las primeras células troncales las llamamos *totipotenciales* debido a que son capaces de producir a un embrión incluyendo sus estructuras extraembrionarias (la placenta, saco vitelino y el cordón umbilical), a éstas las encontramos en la mórula en las primeras etapas del proceso de embriogénesis.⁶ Conforme avanza el desarrollo embrionario las células van perdiendo gradualmente su potencialidad; al llegar al estadio de blastocisto cada una de las células que forman parte de la masa celular interna son incapaces de constituir estructuras extraembrionarias, pero tienen la capacidad de desarrollar cualquier célula de las 3 líneas germinales, a éste tipo celular se le denomina células troncales *pluripotentes*.^{7,8}

Continuando con el proceso de embriogénesis, durante la gastrulación existe una migración y reorganización celular altamente coordinada, que mediante invaginaciones, involuciones y delaminaciones producen la delimitación y diferenciación de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo.⁹ A partir de este punto podemos encontrar diferentes células troncales localizadas en tejidos específicos en el embrión. Estas células son nombradas células troncales *multipotentes* ya que son capaces de generar diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido, limitando su potencial de diferenciación. Un ejemplo son las células troncales hematopoyéticas (HSCs del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) encargadas de dirigir la formación y regeneración de la sangre durante el desarrollo embrionario y la etapa posnatal.¹⁰ Las células troncales hematopoyéticas son capaces de generar una diferenciación a diversos tipos

de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos, monocitos, plaquetas, asesinas naturales, células presentadoras, etcétera).¹¹

Así llegamos hasta las células troncales *unipotentes* que tienen restringida su diferenciación hacia un solo tipo de células, su función es mantener y regenerar al tejido en donde están ubicadas. Un ejemplo claro de células troncales unipotentes son las germinales que migran hacia las gónadas en el desarrollo embrionario (crestas genitales) y eventualmente dan lugar a los gametos mediante la espermatogonia.¹²

El estudio de las células troncales embrionarias humanas se ha visto interrumpido en muchos países por la enorme controversia ética que provocan por ser generadas a partir de los primeros estadios del desarrollo embrionario, usualmente de embriones no implantados de procedimientos de fertilización *in vitro*. En respuesta a este conflicto diversos investigadores se dieron a la tarea de buscar otra forma de obtener células troncales pluripotentes de origen humano; pero no fue sino hasta el 2010 que un investigador japonés llamado Shinya Yamanaka (obtuvo el premio Nobel de medicina por su aportación al mundo científico) logró reprogramar células somáticas de tal forma que se obtenían células con un comportamiento de una célula troncal multipotente; a estas células generadas en el laboratorio las denominaron células troncales pluripotentes inducidas o iPS (del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*). En su protocolo describe cómo fue que se reprogramaron con éxito fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*) y fibroblastos adultos tras una infección con retrovirus que codificaban para diversos factores de transcripción; inicialmente utilizó 21 factores pero en experimentos posteriores depuró a los que no se atribuía la expresión fenotípica de una colonia de células troncales multipotentes hasta llegar a 4 factores imprescindibles: OCT3/4, Sox 2, c-myc y Klf4,

misimos que hacen posible la reprogramación de células somáticas a un estado pluripotente.¹³

El estudio de las células troncales ha sido enfocado tanto a la generación de conocimientos básicos sobre su biología como a su manipulación *in vitro* para posibles aplicaciones clínicas. La investigación sobre células troncales de otros tejidos ha sido el principal objetivo de muchos investigadores. Se cree que muchas células troncales están resguardadas en un área específica dentro del tejido de un adulto en un estado de quiescencia y no se dividen hasta ser activadas por señalizaciones derivadas de enfermedad, lesión o simplemente para sustituir a las células perdidas naturalmente.¹⁴

Estas células troncales son de enorme interés biológico pues no representan ningún dilema ético y muchas veces se pueden obtener a partir de tejidos que son considerados residuos o desechos biológicos como en el caso de la placenta, la sangre de cordón umbilical y los anillos esclerocorneales remanentes después de realizar trasplante de córnea.¹⁵ En las últimas décadas se ha demostrado que una población de células troncales adultas, conocida como *células troncales epiteliales limbales* (CTEL) son las responsables de la generación del epitelio corneal, en respuesta al desgaste normal y después de alguna lesión.

Células troncales epiteliales limbales

La integridad de la córnea, su transparencia y su función dependen de la capacidad de renovación del epitelio corneal y, a su vez, esta capacidad de renovación depende de la población de células troncales localizadas en la región basal del limbo. Anatómicamente, el limbo posee características del epitelio corneal y del epitelio conjuntival, adquiriendo características de zona de transición entre los dos diferentes tejidos (Figura 1A).¹⁶

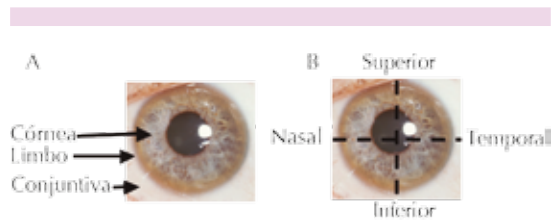


Figura 1. Ubicación del limbo esclerocorneal.
A) Limbo. B) Regiones de del limbo esclerocorneal.

Dadas las características del limbo surgió la hipótesis de que las células troncales epiteliales limbares residían en un microambiente especializado o nicho que regula su mantenimiento, su autorrenovación, su proliferación y su activación mediante señales externas.¹⁷ En 2005 Dua y sus colaboradores identificaron la estructura anatómica donde éstas residen, fue llamada cripta epitelial del limbo, extendiéndose en las empalizadas de Vogt,¹⁸ bajo esas criptas existe una extensa red vascular a través de la cual las células troncales epiteliales limbares reciben factores y citocinas reguladoras para llevar a cabo la proliferación y diferenciación celular. Su distribución en el limbo humano no es homogénea, son más abundantes en las regiones inferior y superior que en las regiones nasal y temporal¹⁹ (Figura 1B).

Identificación

Las células troncales epiteliales limbares comparten características similares con otras células troncales somáticas, incluyendo su tamaño pequeño,²⁰ su elevada relación núcleo-citoplasma,²¹ su ciclo celular²² y un núcleo rico en heterocromatina con nucléolos no diferenciados.²³ No existe marcador biológico definitivo para su identificación pero existen evidencias indirectas como carecer de la expresión de los marcadores de diferenciación como citoqueratina 3 y 12 (marcadores específicos para células epiteliales corneales).²⁴ En

los últimos años se han propuesto diferentes marcadores de diferenciación celular dentro de los que destacan:

ABCG2: la proteína de transporte del casete de unión al ATP subfamilia G miembro 2 ha sido propuesta como un marcador universal de células troncales y por ende un marcador de células troncales epiteliales limbares.²⁵ Zhou y su grupo encontraron la expresión de ABCG2 en células troncales de médula ósea, músculo esquelético y células troncales embrionarias.²⁶ Además se reportó la expresión de ABCG2 en una población de células limbares basales, pero no en poblaciones de células epiteliales corneales, sugiriendo que es un marcador para las células troncales epiteliales limbares.²⁷

p63: este factor de transcripción fue propuesto como marcador por Pellegrini en 2001; reportó que dentro de la córnea el p63 nuclear es expresado por las células basales del epitelio limbal, pero que no se expresa en las células amplificadas en tránsito (TAC, del inglés *Transit Amplifying Cells*) que cubren la superficie de la córnea.²⁸ Por otro lado, se probó su ausencia en ratones *knockout* (p63^{-/-}) donde éstos mostraron defectos importantes en su desarrollo epitelial, además de carecer de epitelio estratificado. Estos resultados sugieren que p63 está implicado en el mantenimiento de la población de células troncales epiteliales limbares.²⁹ En los últimos años se ha usado la isoforma alfa de p63 ya que se encontró que es mucho más específica que otras isoformas, comprobando que es necesaria para el mantenimiento del potencial proliferativo de las células troncales epiteliales limbares y para su capacidad de migración hacia la córnea (Figura 2).³⁰

Células amplificadoras en tránsito

Las células troncales epiteliales limbares, a pesar de ser células troncales unipotentes, en condiciones ideales se pueden dividir simétricamente, para autorrenovarse, y asimétricamente dando

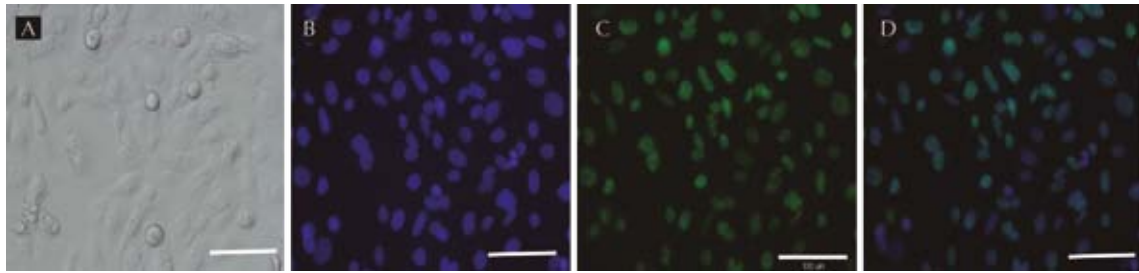


Figura 2. Immunofenotipo p63- α positivo. Se muestran microfotografías de células troncales epiteliales limbares positivas al marcador nuclear p63- α . **A)** Campo claro. **B)** Células teñidas con DAPI. **C)** Marcador p63- α conjugado con Alexa Flúor 488 (verde). **D)** Unión de las imágenes en campo oscuro. La escala representa 100 μ m (imágenes proporcionadas por el Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos a cargo del Dr. Paul Mondragón Terán).

origen a una población de células intermedias progenitoras/precursoras llamadas “células amplificadas en tránsito” (TAC). Una vez dividida la célula amplificada de tránsito va a migrar del nicho para entrar en una vía de diferenciación bajo la influencia de diferentes estímulos.³¹ Estas células no son capaces de autorreplicarse, poseen una capacidad proliferativa limitada y un restringido potencial de diferenciación.³²

Una de las principales funciones de esta población intermedia es incrementar (amplificar) el número de células diferenciadas por cada división de las células troncales, siendo una división finita hasta que se convierten en células completamente diferenciadas o TDC (del inglés *Terminally Differentiated Cells*). El resultado final es la generación de un amplio número de células maduras del mismo fenotipo. Ha sido reportado que las células amplificadas en tránsito provenientes de la división de las células troncales epiteliales limbares migran centripetamente para poblar la región basal del epitelio corneal.^{33,34}

Enfermedades de la córnea y aplicaciones en medicina regenerativa

La deficiencia de células troncales epiteliales limbares genera falta de transparencia y funcio-

nalidad en la córnea humana; esta deficiencia puede ser debida a diferentes causas incluidas: aniridia, displasia ectodermal, toxicidad de medicamentos tópicos, lesión química o térmica, radicación, síndrome de Stevens-Johnson, crioterapia, lesiones debidas al uso de lentes de contacto, queratitis microbial, entre otras.³⁵

A escala mundial se ha reportado que existen 285 millones de personas con discapacidad visual; de ellas 39 millones son casos de ceguera total y 246 millones de visión disminuida.³⁶ Dentro de estos últimos está la ceguera monoocular debida a la deficiencia de células troncales epiteliales limbares y no existe tratamiento farmacológico que regenere la córnea.³⁷

Hay 17 reportes de terapia celular para revertir la deficiencia de células troncales epiteliales limbares; todos basados en la expansión *in vitro*. Algunos reportes utilizan como estrategia el cocultivo con células de fibroblasto de ratón embrionario ‘3T3’, otros emplean membrana amniótica como soporte directo para el cultivo de células troncales epiteliales limbares.³⁸ Pero el uso de fibroblastos de ratón implica riesgo de zoonosis y el uso de membrana amniótica como soporte representa varias desventajas

como variación biológica entre donadores, costosos procesos de análisis para garantizar que la membrana esté libre de agentes patógenos (principalmente virus) y para evitar el potencial riesgo de contaminación al producto final.

Uno de los mayores retos que enfrenta el desarrollo de terapias celulares es el cultivo y óptima expansión que permitan generar cantidades suficientes de células con el fenotipo y genotipo correctos para su trasplante,³⁹ así como su derivación en medios de cultivo químicamente definidos y libre de contacto con otro tipo de células que puedan comprometer la seguridad y eficacia del tratamiento.⁴⁰ Es importante desarrollar nuevas estrategias para la derivación, cultivo y expansión de células troncales epiteliales limbares. Una posible alternativa para la recreación de un nicho *ex vivo* en un cultivo 3D es la basada en el uso de biopolímeros, debido a las características de soporte, capacidad proliferativa, capacidad de mantener viabilidad, contacto celular, contacto con matriz extracelular, propiedades reológicas similares a las de una córnea humana y una posible expansión selectiva, promete ser la alternativa para la producción de sustitutos corneales.

Agradecimientos

Los doctores Paul Mondragón Terán, Juan A. Suarez Cuenca y José Gutiérrez Salinas agradecen el apoyo del “Programa de Investigación Científica y Tecnológica del ISSSTE” (Clave E015). El doctor Paul Mondragón Terán agradece también el apoyo otorgado por el CONACyT a través del fondo de “Apoyos Complementarios para la Adquisición de Equipo Científico” (Clave 188458).

REFERENCIAS

- Can A, A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol* 2008;25:57-9.
- Mummary C, WilmutSI, Van de Stolpe A, Roelen BAJ, Stem Cells Scientific Facts and Fiction: What Are Stem Cells. London, Elsevier 2011; pp:54-66.
- Obokata H, & Vacanti CA. Principles of Tissue Engineering, Stem Cells in Tissue Engineering. London, Elsevier. 2014;31:595- 608.
- Holland S, Leba CQZ, Zoloth L. The Human Embryonic Stem Cell: Science, Ethics and Public Policy. 1ª Ed. USA, 2001; pp:1-50.
- Amat D, Becerra J, Medina MA, Quesada AR and Mari-Beffa M, Stem Cell Therapies: Embryology Updates and Highlights on Classic Topics: Málaga, InTech. España. 2012;8:173-187.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L., et al. Molecular Cell Biology. 5ª ED. México, Panamericana 2005;22:900-908.
- Surani MA, Human Germline: A New Research Frontier. *Stem Cells Reports* 2015;4(6):955-960.
- Kinoshita M. How are pluripotent cells captured in culture? *Reprod Med Biol* 2015;14:85-98.
- Evans MJ and Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. 1981; *Nature* 292: 154–156.
- Silverthorn DU, Johnson BR, Garrison CW, Human Physiology. 4ª Edición. México D.F., Panamericana 2007; 3:81-84.
- Burgess R, Stem Cells Handbook: Introduction to Stem Cells. 2ª Edición. EUA, NY, Human Press.2013
- Potten CS, De Rooij DG, Van Dissel E, Stem Cells: Regulation of proliferation and differentiation of the stem cells in the male germ line. 1ª Edición. California EUA, Academic Press. 1997:283-315.
- Yamanaka S, A Fresh Look at iPs Cells. *Cell* 2009;137: 13-17
- Secker GA and Daniels JT, StemBook: Limbal epithelial stem cells of the cornea. 1ª Edición. The Stem Cell Research Community. 2009 Stem Book, doi/10.3824/stembook.1.48.1
- Kelly EB. Stem Cells. 1ª Edición. USA: Green Wood Press, 200;pp:215
- Osei-BempongCh, Henein Ch, Ahmad S, Culture conditions for primary human limbal epithelial cells. *Regen Med* 2012;4(3):461-470.
- Davenger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in the renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229(5286):560-1.
- Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89:529–532.
- Daniels JT, Harris A, Mason C, Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Rev* 2006;2(3):247- 254.
- Romano AC, España EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SC, Different cell sized in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flowcytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5125–5129.
- Chen Z, De Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ, Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004;22:355–366.

22. Barrandon Y, Green H, Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl AcadSci* 1987;84:2302–2306.
23. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC, Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;3:448–456.
24. Pajooresh-Ganji A, Stepp MA, In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium. *Biol Cell* 2005;97:265–276.
25. Potten CS, Loeffler M Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001–1020.
26. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *NatMed* 2001;9:1028–1034.
27. Watanabe K, Nishida k, Masayuki Y, Terumasa U, Taizo S, Kazuaki Y, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 2004;565:6–20.
28. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondaza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3156–3161.
29. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714–718.
30. Di Lorio E., Barbaro V., Ruzza A., Ponzin D., Pellegrini G., De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:9523–9528.
31. West JD, Dorà JN, Collinson JM, Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. *World J Stem Cells* 2015;7(2):281–299.
32. Hanna C, O'Brien JE. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol*. 1960;64:536–9.
33. Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:434–441.
34. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3:141–157.
35. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44(5):415–425.
36. Organización Mundial de la Salud. [OMS] (2010) Blindness. Disponible en: http://www.who.int/blindness/data_maps/VIFACTSHEETGLODAT2012_2.pdf
37. Ahmad S, Kolli S, Lako M, Figueiredo F, Daniels JT. Stem Cell Therapies For Ocular Surface Disease. *Drug Discov Today* 2010;15;7-8:306–331.
38. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008;115:1899–1997.
39. Mondragon-Teran P, Baboo J, Mason C, Lye JG and Vraitch FS. The full spectrum of physiological oxygen tensions and step-changes in oxygen tension affects the neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Biotechnology Progress* 2011;27(6):1700–1708.
40. Mondragon-Teran Paul, Lye JG, and Vraitch FS. Lowering oxygen tension enhances the differentiation of mouse embryonic stem cells into neuronal cells. *Biotechnology Progress* 2009;25(5):1480–1488.