

# Aislamiento de células epiteliales corneales a partir del limbo esclerocorneal humano

Miguel González Andrades (1,2), Ingrid Garzón (1), Rosa Bellido (2), José Ignacio Muñoz - Ávila (2)

1) Grupo de Ingeniería Tisular, Departamento de Histología de la Universidad de Granada, España

2) Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario San Cecilio de Granada, España

## Resumen

**Introducción:** La obtención de cultivos celulares epiteliales corneales humanos podría ser de gran utilidad tanto para la investigación básica como para su aplicación clínica en el tratamiento de diversas enfermedades corneales.

**Material y Métodos:** Muestras de limbo esclerocorneal procedentes de donante humano cadáver se pusieron en cultivo con medios específicos para células epiteliales con distintos factores de crecimiento. En la mitad de los cultivos se utilizaron células alimentadoras 3T3.

**Resultados:** Se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales corneales con un alto grado de proliferación, sin importar si el crecimiento se dio sobre células 3T3 o no. La tasa de contaminación de los cultivos fue menor en aquellos donde sí se encontraban estas células alimentadoras.

**Discusión:** La obtención de células epiteliales corneales es posible en el laboratorio a partir de pequeñas biopsias del limbo esclerocorneal tras su expansión en cultivo, utilizando una técnica de cultivo estándar, fácilmente reproducible.

**Palabras clave:** limbo esclerocorneal, ingeniería tisular, epitelio corneal, cultivos celulares.

## Abstract

**Introduction:** The achievement of human corneal epithelial cultures could be useful not only for research purposes, but also for clinical applications in the treatment of several corneal diseases.

**Material and Methods:** Sclerocorneal limbi were obtained from human donors and cultured in specific medium containing several hormones and growth factors. Half of the cultures were established using a layer of 3T3 feeder cells.

**Results:** we obtained primary cultures of corneal epithelial cells with a high proliferation rate in culture. No relationship with the use of a 3T3 feeder cell layer was found, but the likelihood of fibroblast contamination in the epithelial cultures was lower when these cells were used.

**Discussion:** Establishing primary cultures of corneal epithelial cells from small explants of limbal tissue is a technique that can be carried out in the laboratory using standard culture methods.

**Key words:** corneal limbus, tissue engineering, corneal epithelium, cell culture.

## 1. Introducción

El limbo esclerocorneal es una zona de transición entre la córnea y la esclerótica. Histológicamente, el epitelio del limbo es la zona que separa el epitelio columnar conjuntival del epitelio escamoso estratificado

de la córnea. El estroma corneal pierde aquí su transparencia, y sus láminas pierden su disposición ordenada, las fibras de colágeno aumentan de tamaño y su disposición es más parecida a las de la esclera (1).

Aunque el tamaño del limbo esclerocorneal es muy reducido, su papel es fundamental en la fisiología del polo anterior del globo ocular, cumpliendo para ello distintas funciones de las cuales destacamos las siguientes: nutrición de la córnea periférica, cicatrización corneal, regeneración del epitelio corneal, inmunovigilancia y respuestas de hipersensibilidad y función de barrera, para impedir que el tejido conectivo escleral y conjuntival alcance la córnea (1). Probablemente, la más importante de dichas funciones es la de actuar como reservorio de células madre del epitelio corneal y, por tanto, permitir la regeneración y mantenimiento de este epitelio; para ello, el limbo esclerocorneal presenta unas zonas especializadas con una rica vascularización e inervación, más prominentes en el limbo superior e inferior, denominadas "empalizadas limbares de Vogt" (2) en las cuales se origina el epitelio corneal a partir de las células basales de estas estructuras. Se trata de células madre de diferenciación epitelial (3) que están fuertemente unidas a la membrana basal (4). Estas células madre poseen una alta actividad mitótica, caracterizada por una división celular asimétrica.

Además, debido a su importante papel en el mantenimiento del epitelio corneal, cualquier patología que afecte al limbo esclerocorneal puede desembocar en un daño grave para el epitelio de la córnea. En concreto, el déficit de células madre limbares produce una inadecuada regeneración del epitelio corneal, provocando defectos epiteliales persistentes, y un fracaso de la barrera corneal, que se asocia a la invasión de la córnea por parte del epitelio conjuntival, pudiéndose acompañar posteriormente de una inflamación crónica con alteración de la transparencia corneal (5)(6).

En este contexto, el presente trabajo tiene por objeto describir un método para el aislamiento de células epiteliales a partir de limbos esclerocorneales obtenidos de donantes humanos. Para ello se procedió a la extracción de los mismos, aislándolos y cultivándolos para obtener cultivos celulares primarios de epitelio corneal, eventualmente útiles para la ingeniería tisular y otras aplicaciones biomédicas. En el trabajo evaluamos los efectos que genera la utilización o no de células alimentadoras en el desarrollo y mantenimiento de los cultivos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Obtención de córneas y limbos esclerocorneales

En este trabajo se utilizaron muestras de limbo esclerocorneal correspondientes a dos trasplantes de córnea de donante cadáver. Para el transporte, las muestras se mantuvieron en frío (4° C) en medio citoprotector estéril Optisol.

Las muestras de limbo se procesaron durante las 6 horas posteriores a su llegada al laboratorio para asegurar una elevada supervivencia celular y tisular. Se lavaron dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1.25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

A continuación, los limbos esclerocorneales se examinaron bajo visión microscópica, para eliminar cualquier resto de conjuntiva, iris u otros tejidos que pudiesen contaminar o impedir el crecimiento de las células epiteliales corneales.

### 2.2 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales corneales

Para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales, los limbos esclerocorneales se dividieron cada uno, en seis pequeños explantes de alrededor de 2 X 2 mm<sup>2</sup> y 100 µm de espesor mediante fragmentación mecánica de los mismos en condiciones de esterilidad. Para favorecer la adhesión de los explantes limbares a las superficies de cultivo, dichos explantes se depositaron con el epitelio en contacto directo con la superficie de frascos de cultivo estériles de 25 cm<sup>2</sup>, desprovistos de medio de cultivo. Quince minutos más tarde, cuando los explantes se adhirieron a las superficies de cultivo, se procedió a añadir el medio de cultivo específico para células epiteliales.

Para evitar el crecimiento no deseado de queratocitos y fibroblastos, cuya tasa de proliferación es habitualmente muy superior a la de las células epiteliales de la córnea, los explantes de limbo esclerocorneal se sembraron y cultivaron bajo condiciones selectivas que favorecían el crecimiento de las células epiteliales e inhibían la adhesión y la proliferación de las células estromales procedentes de la propia muestra, según se detalla a continuación:

En primer lugar, se empleó medio de cultivo selectivo para células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales corneales sobre los fibroblastos y los queratocitos. El medio consistió en dos partes de medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinheim, Alemania) y una parte de medio Ham F-12 (Sigma-Aldrich Ref. N6658). Además se le añadió suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinheim, Alemania), adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795), solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B) y factores de crecimiento para células epiteliales en cultivo: insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. I2767), triiodotironina (1.3 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. T5516), toxina colérica (8 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. C3012), hidrocortisona (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. H0888) y factor de crecimiento epidérmico EGF (10 ng/ml) (Becton-Dickinson Ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU).

En segundo lugar, la mitad de los explantes esclerocorneales se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie que contenían una capa de células alimentadoras 3T3 (ECACC 85022108) inactivadas a una densidad de 8-10 × 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>. La inactivación de las células 3T3 se llevo a cabo mediante irradiación (6.000 rads) o mediante tratamiento con mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. M4287, Saint Quentin-Fallavier, Francia) durante 2 horas a 37°C. En la otra mitad de los casos, se prescindió de esta capa de células alimentadoras, cultivándose los explantes esclerocorneales directamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

Posteriormente, las células se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días.

### 2.3 Análisis estadístico

Para la comparación de tasas de crecimiento correspondientes a métodos de cultivo celular, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para la identificación de diferencias entre diferentes porcentajes, se usó el test exacto de Fisher. En todos los casos, se seleccionó un valor de

significación  $\alpha$  del 5% como nivel de significación estadística para los tests de doble cola.

## 3. Resultados

Las células de epitelio corneal se obtuvieron a partir de explantes tisulares de limbo esclerocorneal humano, los cuales se cultivaron usando medios y técnicas de cultivo celular estándar. Los explantes limbares se cultivaron directamente sobre frascos de cultivo en presencia o ausencia de células de soporte 3T3 inactivadas.

En ausencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células de epitelio corneal tienden a migrar desde el explante (fig. 1A) alrededor del 5º día de cultivo, para alcanzar la confluencia y formar una monocapa de células después de 17,5 días de cultivo (17,5 ± 2,5 días) (fig. 1C). En presencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células epiteliales corneales comienzan a desplazar a las células alimentadoras y a adherirse a la superficie del cultivo alrededor del 7º día de cultivo (fig. 1B), alcanzando la confluencia en 29,5 días (29,5 ± 1,5 días) (fig. 1D). Una vez cultivadas, las células de epitelio corneal muestran una morfología típica poliédrica (fig. 1B). A diferencia de los resultados obtenidos y publicados por otros autores (7), que refieren un crecimiento más rápido de las células epiteliales cuando éstas son cultivadas con células 3T3, las diferencias en nuestro estudio no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$  para la prueba U de Mann-Whitney), por lo que la tasa de proliferación de las células epiteliales fue similar en ambos grupos (con o sin células alimentadoras de soporte). No obstante, el uso de la capa alimentadora previno la contaminación estromal del cultivo de epitelio, que apareció en el 40% de los casos en los que las células epiteliales se cocultivaron con las células 3T3, mientras que esta contaminación se detectó en el 80% de los cultivos sin la capa alimentadora. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para el test exacto de Fisher ( $p < 0.001$ ).

## 4. Discusión

La obtención de cultivos celulares primarios a partir de muestras de limbo esclerocorneal humano presenta una gran utilidad, tanto en investigación básica, como en clínica (8).

Desde años atrás, se han intentado mantener en cultivo distintos tipos de estirpes celulares no neoplásicas, con la dificultad que supone el hecho de que las células euplásticas presenten un crecimiento limitado a varias generaciones. Durante las dos últimas décadas, se ha avanzado notablemente en el cultivo de células epiteliales procedentes del limbo esclerocorneal humano, aunque el cultivo celular a partir de biopsias del mismo aún presenta dificultades (9)(10)(11).

En el presente trabajo, se describe una técnica para la obtención de cultivos celulares primarios a partir de explantes de limbo esclerocorneal humano. El método llevado a cabo por nuestro grupo es una modificación de la metodología propuesta inicialmente por Ebato et al (12) para el cultivo de células epiteliales corneales, y modificado posteriormente por varios autores (13). Mediante esta técnica, hemos conseguido individualizar con éxito una de las principales estirpes celulares existentes en la córnea, concretamente, células epiteliales corneales.

Las posibles aplicaciones de estas células humanas mantenidas en cultivo procedentes del limbo esclerocorneal son múltiples. Por un lado, el estudio de la ultraestructura (14) de una de las principales células que constituyen la córnea, se puede llevar a cabo utilizando estas células de gran capacidad proliferativa. Por otro lado, los estudios funcionales, farmacológicos o de expresión génica, son muy difíciles de llevar a cabo en biopsias corneales o limbares de pequeño tamaño, por lo que la posibilidad de contar con una cantidad prácticamente ilimitada de células puede abrir nuevas perspectivas en estos campos (15)(16)(17). Finalmente, disponer de uno de los principales componentes celulares de la córnea posibilita la fabricación de tejidos vivos en el laboratorio para su eventual uso en oftalmología (18)(19), no sólo para su utilización en la construcción de córneas biológicas organotípicas mediante ingeniería tisular, sino, además, abre nuevos campos de investigación relacionados con el tratamiento de la patología de la superficie ocular, incluyendo implantes de células expandidas ex

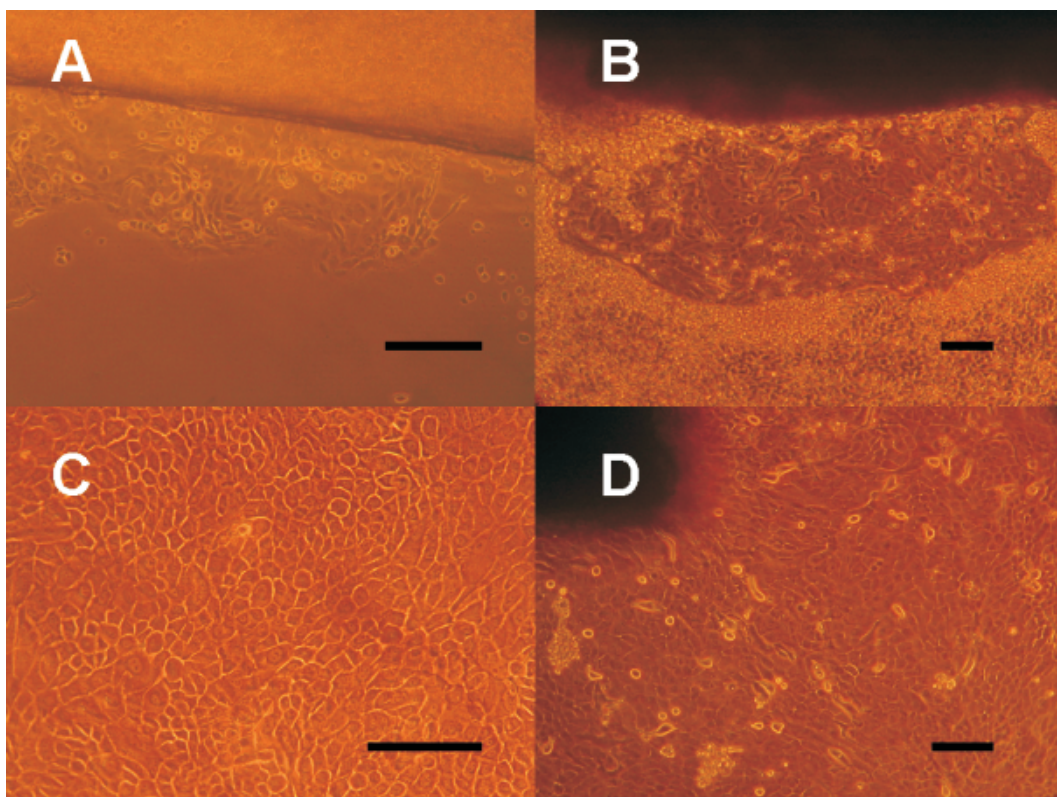


Figura 1: Imágenes de microscopía óptica de contraste de fase, de cultivos de epitelio corneal humano: inicialmente, las células epiteliales crecen a partir del explante de limbo esclerocorneal, formando una isla (fig. A, sin células alimentadoras 3T3) que desplaza a las células de soporte 3T3 cuando estas se utilizaron en el cultivo (fig. B). Tras varios días de cultivo, las células alcanzaron su confluencia tanto en ausencia (fig. C) como en presencia de células 3T3 (fig. D). Escala: 200µm.

vivo con o sin la utilización de soportes de membrana amniótica (20)(21)(22), etc. En este sentido, los grandes avances experimentados en la ingeniería tisular han permitido construir tejidos como la piel, el urotelio, la mucosa oral y la córnea (10)(18)(23).

La técnica que desarrollamos en el presente trabajo, basada en el cultivo de explantes de limbo esclerocorneal, demostró una elevada eficiencia a la hora de generar cultivos celulares confluentes. Frente a otras técnicas más complejas basadas en la individualización de las células madre del limbo esclerocorneal, la técnica de explantes es técnicamente sencilla y puede ser llevada a cabo incluso sobre fragmentos de tejido de muy reducido tamaño. De este modo, un pequeño fragmento de biopsia del limbo esclerocorneal podría generar un elevado número de células epiteliales corneales en un periodo de tiempo relativamente corto, gracias a la propagación y diferenciación de las células madre del limbo esclerocorneal (19).

Al mismo tiempo, el uso de una capa alimentadora de células previamente inactivadas (células 3T3 de embrión de ratón), se ha relacionado en estudios previos con una mayor tasa de proliferación en células de epitelio corneal cultivado, respecto a cultivos sin esta capa alimentadora (7)(24). Nuestros resultados, sin embargo, mostraron que las células de epitelio corneal presentan niveles de crecimiento similares con o sin la capa de células alimentadoras, aunque esta técnica de cultivo ayudó a evitar la eventual contaminación del cultivo por células estromales. Al mismo tiempo, la utilización de células y otros elementos de origen animal a nivel hospitalario en ensayos sobre humanos está muy restringida en la mayoría de los países por su posible transmisión de enfermedades xenobióticas (25). Por todo ello, creemos que la técnica de explantes de limbo esclerocorneal humano en la que no se utilizan células de soporte como ya han abogado otros grupos (26), es la más adecuada para la expansión en cultivo de células epiteliales corneales con fines biomédicos.

---

Financiado por: FIS 08/614

---

## Referencias

1. Kanski JJ. Oftalmología clínica. Elsevier: Madrid; 2002.

2. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80:155-171.
3. Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA. Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol* 2004; 48(8-9):981-91.
4. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44:415-425.
5. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006; 12:65-75.
6. Di Iorio 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* 2005; 102(27):9523-8.
7. Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guerin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:497-527.
8. Griffith M, Watsky MA, Chia-Yang L, Trinkaus-Randall V. Epithelial cell culture: cornea. En Atala A, Lanza RB. *Methods of Tissue Engineering*. Academic Press: San Diego; 2001.
9. Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22, S28.
10. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosa epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351:1187-96.
11. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:5608.
12. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999; 97:891-986.
13. 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(1):41-9.
14. Bergmanson JP, Horne J, Doughty MJ, Garcia M, Gondo M. Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens* 2005; 31(6):281-7.
15. McCanna DJ, Harrington KL, Driot JY, Ward KW, Tchoo R. Use of a human corneal epithelial cell line for screening the safety of contact lens care solutions in vitro. *Eye Contact Lens* 2008; 34(1):6-12.
16. Castro-Muñozledo F. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Exp Eye Res* 2008; 86(3):459-69.
17. Reichl S. Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60(3):299-307.
18. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(8):3311-7.
19. Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA, Germain L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2009; 482:233-56.
20. Kim MK, Heo JW, Lee JL, Wee WR, Lee JH. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after in vivo transplantation. *Curr Eye Res* 2005; 30(8):639-46.
21. Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(12):1437-9
22. Ma DH, Yao JY, Yeh LK, Liang ST, See LC, Chen

HT et al. In vitro antiangiogenic activity in ex vivo expanded human limbal corneal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8):2586-95.

23. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(5):1113-25.

24. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006; 12:65-75.

25. Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2007; 2(6):919-27.

26. Higa K, Shimazaki J. Recent advances in cultivated epithelial transplantation. *Cornea* 2008; 27(S1): S41-7.