

Síndrome de Insuficiencia Limbal.

Francisco Arvelo^{1,2}, Felipe Sojo¹ y Carlos Cotte².

¹Centro de Biociencias, Fundación IDEA. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartanejas, Baruta, Edo. Miranda, Venezuela.

²Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: epitelio corneal, células madre limbocorneales, insuficiencia limbica, terapia celular.

Resumen. La córnea, el tejido transparente del ojo, está formada por un epitelio de cinco capas diferenciadas que está en continua renovación mediante una población de células madre limbocorneales ubicadas en su capa basal. Su actividad normal depende de una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos, que de alterarse, pueden llevar a la pérdida parcial o total de las células progenitoras provocando la pérdida progresiva de la visión. Esta revisión pone de manifiesto la importancia de esta patología invalidante, constituyendo un gran problema de salud. Para tratarla se han desarrollado varias técnicas, siendo la más usada, históricamente, el trasplante de limbo mediante autoinjerto o aloinjerto acompañado de un tratamiento para inhibir la inflamación y la neovascularización. En la actualidad este procedimiento está siendo sustituido por las nuevas técnicas de ingeniería de tejidos, que tienen múltiples ventajas, como más seguridad, eficacia, eliminación de los riesgos de rechazo, disminución del tiempo de tratamiento y reducción de los costos. Usar las células limbales en cultivo ha hecho posible desarrollar técnicas cada vez más perfeccionadas y seguras, por lo que en la presente revisión se enfatiza en una de estas técnicas, la cual ha probado ser eficaz y ventajosa para obtener el epitelio de la córnea *in vitro*.

Limbal Deficiency Syndrome.

Invest Clin 2012; 53(2): 205 - 217

Key words: corneal epithelium, limbocorneal stem cells, limbic deficiency, cell therapy.

Abstract. The cornea, the transparent tissue of the eye, is formed by an epithelium of five distinct layers that is in continual renewal through a population of limbocorneal stem cells located in the basal layer. Its normal activity depends on a variety of intrinsic and extrinsic factors, that altered, can lead to partial or total loss of progenitor cells leading to a progressive loss of vision. This article reviews the importance of this crippling disease, constituting a major health problem. Several techniques have been developed, but the transplant of the limbus using autograft or allograft accompanied by a treatment to suppress inflammation and neovascularization is still the most widely used. At present, this procedure is being replaced by the new techniques of tissue engineering, which have multiple benefits, such as more safety, efficiency, elimination of the risks of rejection, decrease of time of treatment and lower costs. The use of limbal cells cultures has made possible to develop a more secure and refined technology. In this review we emphasize one of these techniques, which has proven to be very effective and advantageous to produce the epithelium of the cornea *in vitro*.

Recibido: 28-12-2011. Aceptado: 07-06-2012

INTRODUCCIÓN

La córnea es un tejido con características muy particulares que le permiten al ojo cumplir su función fundamental. Orgánicamente consiste en una lente cóncavo-convexa con una cara anterior cubierta con una película lagrimal más una cara posterior bañada por el humor acuoso (1). Estructuralmente es una membrana regular y uniforme formada por un conjunto ordenado de fibras de colágeno de estrecho diámetro y sin vasos sanguíneos, lo cual le confiere transparencia. En cuanto a las lágrimas y el humor acuoso, sus funciones son vitales al encargarse de mantener sus requerimientos fisiológicos de hidratación, lubricación, intercambio y protección. Debido a su morfología la córnea tiene una gran capacidad refractiva, actuando como un lente conver-

gente con un poder de refracción en su cara anterior de aproximadamente 48,8 dioptrías y de 5,8 dioptrías en su superficie posterior (2).

La córnea está cubierta por un epitelio estratificado no queratinizado que representa el 10% de su grosor, el cual contiene cinco capas en su región central y cerca de diez en la zona periférica, formando una barrera eficaz contra la entrada de patógenos y protegiendo de los factores físicos externos. Las células del epitelio son constantemente renovadas por proliferación de las células madre limbales (CML por sus siglas en español) localizadas en la región basal del epitelio. Las células más superficiales del epitelio mueren por apoptosis, se desca-man periódicamente y tienen un promedio de vida de 3 a 7 días, no estando aun claros los mecanismos moleculares de su regula-

ción (3, 4). Las evidencias acumuladas indican que su función está determinada por el microambiente que las rodea, el denominado “nicho limbal” (5-7).

Cuando las CML son lesionadas y destruidas o el nicho limbal es disfuncional, puede surgir un estado patológico conocido como “síndrome de insuficiencia limbal”, el cual puede ser definido como “la incapacidad de las células CML de mantener la integridad del epitelio de la córnea”. Con esta revisión se aporta información sobre la histología y fisiología del epitelio de la córnea tanto en condición normal como patológica, discutiéndose adicionalmente la utilización de las nuevas técnicas de Ingeniería de Tejidos como medio terapéutico avanzado y efectivo para el tratamiento del paciente con el síndrome limbal.

I. EPITELIO DE LA CÓRNEA Y SÍNDROME LIMBAL

Estructura del epitelio de la superficie ocular

La superficie ocular está compuesto por tres epitelios distintos que se originan de la superficie ectodérmica y tienen en común ser estratificados, escamosos y no queratinizados. Ellos difieren en cuanto a otras características particulares que están determinadas por su ubicación y sus funciones específicas. Esos tres epitelios son:

1) El epitelio de la conjuntiva. Es un epitelio estratificado escamoso no queratinizado y bien vascularizado que contiene células caliciformes secretoras de mucina, la cual contribuyen a mantener la capa lagrimal de la superficie ocular. Sus células madre o CM –que en inglés son las denominadas *stem cell* o SC– tienden a localizarse tanto en las áreas de mayor grosor como en las zonas de mayor pigmentación de este epitelio. Se ha encontrado que las células progenitoras del epitelio conjuntival son bi-potenciales, siendo precursoras tanto de

células caliciformes como no caliciformes (8). En cuanto a la diferenciación de las células caliciformes, ellas parecen requerir de un medio ambiente constituido por un estroma más específico, como se demostró con estudios de células epiteliales conjuntivales sobre membrana amniótica (9). La diferencia entre los fenotipos epiteliales corneales y conjuntivos se basa en la expresión de diferentes queratinas –mucinas–, siendo las citoqueratinas CK4 y CK13 las que se expresan en el epitelio conjuntival (10).

2) El epitelio del limbo. Este epitelio está en la zona de transición entre el epitelio de la córnea y el epitelio de la conjuntiva, siendo morfológicamente diferente a ambos. Se diferencia del corneal por poseer melanocitos y células de Langerhans, que son dendríticas presentadoras de antígenos; en cuanto al conjuntival, carece de sus células caliciformes. Las células basales del limbo se disponen en una monocapa de células cilíndricas sobre la membrana basal a la que se une por medio de hemidesmosomas que se fijan a las fibras de anclaje de dicha membrana, compuesta por colágeno tipo VII que penetra en la estructura del estroma uniéndose a placas compuestas por colágeno tipo IV y VII. Las células de este epitelio son mitóticamente activas y sus núcleos se disponen perpendicularmente a la superficie, siendo ricas en filamentos de actina que desempeñan un papel muy importante en la migración celular. El epitelio limbal se encuentra sobre un estroma altamente vascularizado, cuyos vasos forman parte de las *empalizadas de Vogt*, lo que permite un contacto estrecho entre vasos sanguíneos y epitelio, aportando altos niveles de nutrientes y oxígeno (11, 12).

La sustitución de las células de la córnea que mueren por apoptosis, manifestando un mecanismo de autorenovación semejante al que ocurre en la epidermis, el epitelio intestinal y en el mecanismo de la hematopoyesis (13, 14). En todos estos teji-

dos las células están jerarquizadas en tres niveles: a) holoclonos, las células CM, que se encuentran localizadas en el limbo; b) paraclones, *células amplificadoras transitorias* (CAT), terminalmente diferenciadas; c) meroclonos, consideradas “paraclones jóvenes” por su mayor capacidad proliferativa (15). Así como se ha demostrado la existencia de los holoclonos en el limbo corneal, también se ha demostrado la gran mayoría de células CAT en el epitelio corneal, estando dada su importancia por tener la capacidad de constituir un tejido que se auto-renueva constantemente, lo cual es esencial, indicando su propio nombre que “amplifican cada división de las primeras”. De esta forma se reduce el número de divisiones de los holoclonos, lo que significa que las células CM conservan su carga genética y se reduce la acumulación de mutaciones (16). Independientes de su localización, las CM presentan una serie de características fundamentales: una vida larga; un potencial ilimitado para dividirse; un ciclo lento de división; poca o nula diferenciación, y estar convenientemente ubicadas en sitios protegidos que aseguran su función y viabilidad (17).

3) El epitelio de la córnea. Este epitelio utiliza como estrategia para expandir su población celular el reclutamiento de las células CM, lo cual hace posible que se produzcan más *células de tránsito amplificadas* (CTA), haciendo que aumente su tasa y eficacia de la replicación (18). Las CML se encuentran en la capa basal del epitelio limbal mientras que las CAT se encuentran en la capa basal de todo el epitelio corneal, creando un movimiento celular centrípeto que es el responsable de la regeneración del epitelio corneal central (17). Conforme las células se van moviendo de esa forma también van desarrollando características de células CAT y adquiriendo marcadores *de novo*, como las citoqueratinas 3 y 12, correspondientes al fenotipo diferenciado (19). La capa basal del epitelio limbal con-

tiene tanto células CM como células CAT; mientras que el epitelio corneal está constituido por una jerarquía de las células CTA, localizadas en la periferia con capacidad de multiplicarse varias veces, mientras que las localizadas en la córnea central presentan una capacidad de división muy limitada, constituyendo colonias terminales (18). Por otra parte, las células limbocorneales no se encuentran en igual proporción alrededor de la superficie esclero-corneal, encontrándose su mayor proporción en la superficie superior e inferior en comparación a la región temporal y nasal (20).

Importancia del microambiente del estroma

Los estudios han puesto de relieve el papel fundamental del *microambiente del estroma* o *nicho limbal* en el mantenimiento y la homeostasis tanto del limbo como del epitelio de la córnea (21). Si bien las características específicas del nicho no han sido completamente caracterizadas, este debe incluir los factores celulares y extracelulares (22), esto queda demostrado por los fibroblastos del estroma, los cuales son componentes fundamentales debido a su interacción íntima con el epitelio a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento (21, 23-25). También es evidente que algunos de los factores que proceden de la sangre también ayudan a mantener las células en estado indiferenciado, tal como ocurre con las pequeñas proyecciones del epitelio limbal, llamadas *empalizadas de Vogt* (1, 26).

Las citoquinas se expresan de diferentes maneras tanto en el limbo como en la córnea central, estando clasificadas en tres grupos: a) citoquinas tipo I, como la interleucina IL-1 β producida por las células epiteliales corneales, la cual estimula la producción de las citoquinas III en los fibroblastos del limbo y la córnea; b) citoquinas tipo II como la TGF- β 1 producidas por las

células en proceso de epitelización, que inhibe la producción de citoquina tipo III por los fibroblastos del limbo y la córnea; e) citoquinas tipo III, como el factor de crecimiento de queratinocitos (keratinocyte growth factor o KGF, por sus siglas en inglés) producido por los fibroblastos del limbo y el factor de crecimiento de los hepatocitos (hepatocyte growth factor o HGF, por sus siglas en inglés), producido por los fibroblastos de la córnea; ambos controlan sinérgicamente la cicatrización de las heridas corneales (27-30).

Como fue mencionado, la preservación de las células CML dependen de las condiciones del medio interno y externo, por lo que su regeneración requiere condiciones específicas que solo se encuentren en el nicho donde están localizadas estas células (31). Fuera de estas condiciones ellas proliferan desarrollando una expresión gradual de diferentes marcadores celulares, por lo que durante la diferenciación se van expresando nuevos genes a la vez que se suprimen otros previamente expresados. Los estados intermedios presentan gran capacidad proliferativa, pero después de un número de replicaciones esta capacidad va disminuyendo hasta alcanzar la diferenciación terminal (32).

Marcadores histológicos de las células madre de la córnea

Aunque se han propuesto numerosas moléculas como marcadores histológicos de las células CML, su importancia real en su identificación sigue siendo controversial (5), por lo que un reto importante es encontrar un marcador seguro y específico que las diferencie de los otros tipos celulares. En la actualidad los marcadores más satisfactorios que se pueden usar son aquellas especies moleculares que presentan una mayor expresión en las células basales, como lo son p63 y ABCG2 (ATP-Binding Cassette G2). También se han propuesto otros posibles marcadores como lo son K19,

la vimentina, el KGF-R y la alfa enolasa, casi todos ellos marcadores de células indiferenciadas. El marcador p63 es un factor de transcripción que pertenece a la familia de la p53 y p73 (33,34). Existen seis isoformas de p63, y la transcripción de diferentes promotores genera dos moléculas diferentes de ARNs mensajero: TAp63 y Δ Np63. El empalme alternativo de cada transcrito produce las isoformas α , β , γ respectivamente (35, 36).

Los queratinocitos oculares pueden contener todas las isoformas Δ N, siendo Δ Np63 α la más abundante, presente en los holoclonos del limbo, pero no en la córnea central (37). Por otra parte se reveló que ANp63 α y la integrina 1 β son marcadores que representan la misma población celular dentro de la epidermis humana. Se podría pensar que ANp63 α controlaría la expresión de la integrina 1 β , la cual a su vez podría regular señales ejercidas desde la matriz extracelular hacia la cascada de transcripción de p63. Por otra parte, un miembro de la familia de las integrinas, la subunidad 3 α , está bajo control transcripcional de las isoformas de ANp63 α , lo cual provee una base molecular a la hipótesis de que la familia p63 es esencial para el control del destino de las células CM por las interacciones entre la epidermis y el mesénquima (38).

En cultivos autólogos de células epiteliales limbales se encontró una marcada expresión de las citoqueratinas 14 y 19, más expresión elevada de p63, asociada a bajos niveles de expresión de citoqueratina 3. Estos bajos niveles de expresión confirman la baja diferenciación de este epitelio limbal, mientras que existe una co-expresión de las citoqueratinas 14, 19 y p63; lo que se asocia a un gran potencial proliferativo de las células epiteliales limbales (39-42). También se ha demostrado como la proteína transportadora ABCG2 se encuentra en la membrana celular y en el citoplasma de

la mayoría de las células basales del epitelio limbal, pero no en las células epiteliales corneales. Se le considera un marcador de superficie útil en la identificación y aislamiento de las células CML, aunque su función específica es aún desconocida. Hay hipótesis que hacen referencia al papel fisiológico de ABCG2 en la protección de las células CM en la excreción de sustancias genotóxicas (5, 43, 44). En la presente revisión es importante señalar que se ha observado cómo ciertos marcadores no se expresan o lo hacen mínimamente en el epitelio basal limbar, siendo ellos la conexina 43, las citoqueratinas 3 y 12, la nestina, la cadherina E y la involucrina. Algunos de estos marcadores son específicos del epitelio corneal diferenciado (1, 45).

Es importante señalar algunas propiedades y características significativas de las CM, tales como: a) ser originadas en el ectodermo neural, lo cual se constata *in vitro* al haberse demostrado mediante reacciones inmuno-histoquímicas la presencia de receptores a neurotransmisores tales como gaba, dopamina o serotonina, hecho que determina las propiedades neurológicas de origen (46-48); b) en condiciones normales, la invasión corneal por parte del epitelio conjuntival vecino es impedida por las células limbares; c) la conjuntivalización corneal produce una tinción anómala con fluoresceína, la cual es tardía debido a que el epitelio conjuntival deja pasar la fluoresceína a diferencia del epitelio corneal; d) al dañarse las células limbares, el epitelio conjuntival migra sobre el estroma corneal, produciendo la conjuntivalización, que se acompaña de vascularización corneal (1).

Patologías de la córnea y deficiencias de las células madre limbares

Hay algunas patologías de la córnea cuya naturaleza se asocia con las deficiencias de las CML (49). Tales deficiencias se deben a los siguientes fenómenos:

1. Por *aplasia*, que es la pérdida total de las CML debida a una destrucción primaria:
 - *traumáticas*, por daño químico, daño térmico o inducido por lentes de contacto.
 - *iatrogénicas*, producidas por cirugías limbares múltiples o por medicamentos tópicos utilizados a largo plazo (toxicidad)
 - *autoinmunes*, producidas por el síndrome de Stevens-Johnson; por penfigoide ocular cicatricial o por queratoconjuntivitis atópica.
2. Por *hipofunción*, que es la pérdida gradual de la función de las CML debido a soporte estromal insuficiente, que puede ser debida a:
 - *hipofunción* congénita, como lo es la aniridia, la displasia ectodérmica, el síndrome de queratitis-ictiosis-sordera y la queratitis asociada con deficiencias endocrinas múltiples.
 - *hipofunción neural o isquémicas*, la queratopatía neutrófica
 - *hipofunción inflamatorias e infecciosas*, producidas por limbitis crónica o queratitis ulcerativa corneal periférica.
 - *hipofunción* de otros tipos, como los producidos por el pterigión y pseudo pterigión idiopático.

II. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LIMBAL

Manejo de la insuficiencia limbal

En el tratamiento de la insuficiencia limbal se han utilizado, como soporte, los lubricantes tópicos, los lentes de contacto terapéuticos y la tarsorrafia (50); de desarrollarse opacidad corneal grave se recurría a la queratoplastia lamelar o penetrante (51). Ya que el síndrome de insuficiencia limbal está relacionado con la deficiencia de las CML o una disfunción de éstas por las alteraciones del microambiente que las

rodea, el tratamiento debe ir encaminado a repoblar el limbo y preservar la integridad esclero-corneal, siendo por tanto su objeto mantener los procesos de reparación epitelial tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Así, cuando la integridad del limbo se encuentre comprometida, es de suma importancia asegurar su reconstrucción anatómica y funcional con el objeto de mantener una población suficiente de las CML para poder asegurar la regeneración epitelial corneal (52, 53). A continuación hablaremos sobre los principales recursos y tratamientos que se han utilizado hasta el presente para tratar de resolver la insuficiencia limbal.

Lágrimas artificiales. Estas no tiene ningún efecto sobre la actividad de las células CM, sin embargo suele mejorar sintomáticamente las molestias derivadas de la sequedad ocular que acompaña a estos procesos (54).

Suero autólogo. Por sus numerosos factores activos, tales como el factor de crecimiento epitelial, la fibronectina, la vitamina A, el factor transformador de crecimiento de fibroblastos, las antiproteasas, las anticolegenasas, etc., el suero autólogo contribuye a mejorar el microambiente, y facilita los distintos mecanismos implicados en la renovación y mantenimiento celular del epitelio (55).

Trasplante con membrana amniótica. Las membranas fetales han sido uno de los elementos biológicos más antiguos que se han utilizado en el tratamiento de diversas patologías que requieren regeneración tanto cutánea como mucosa. Entre ellas destaca la membrana amniótica, constituida por un epitelio formado por una monocapa de células con su membrana basal y una matriz estromal (56). Presenta propiedades tanto mecánicas como biológicas de importancia fundamental para la reconstrucción tisular, ya que su epitelio produce factores de crecimiento, lo cual le da un gran valor

terapéutico. Particularmente la membrana basal es muy similar en su composición a la membrana basal de la córnea, actúa como buen sustrato y favorece la migración y adhesión de las células epiteliales. Adicionalmente, facilita la proliferación de las células progenitoras del epitelio corneal y promueve la diferenciación celular. La matriz estromal reduce la formación de tejido de granulación y cicatrización, además de favorecer la supresión del factor de crecimiento transformante, disminuye la neovascularización y la inflamación, la cual produce retrasos en la epitelización (57, 58). Así, cuando es usada para el tratamiento de la cornea, la membrana amniótica mejora significativamente el medio ambiente de la matriz extracelular de las células epiteliales limbares, siendo muy útil para el tratamiento de pacientes con insuficiencia limbal parcial, ya que sus distintos factores favorecen el desarrollo y expansión de las CML. Sin embargo, se ha podido demostrar que en el caso de pacientes que presentan aniridia, el tratamiento con la membrana amniótica solo ofrece resultados transitorios (59, 60). Asimismo; ya se ha demostrado que para mejorar las probabilidades de éxito, al usar implantes con la membrana amniótica, es necesario eliminar sus células para trabajar solo con la matriz de soporte, ya que ellas pueden causar rechazo inmunológico, por lo que resulta muy conveniente eliminarlas (61-63).

Trasplante de tejido limbal. Este trasplante está indicado en aquellos casos en los que existe una conjuntivalización del epitelio corneal por no regenerarse un epitelio con las características de la córnea (64). Ha sido demostrado que la regeneración epitelial inducida por el procedimiento de trasplante límbico mejora los procesos de reparación estromal, facilitando la regresión de la opacidad, y por ello, una mejor recuperación de la transparencia. Para practicar trasplante de limbo han sido consideradas las siguientes opciones:

1. *Auto-trasplante desde un mismo ojo o del contra-lateral.* Consiste en la transferencia de tejido limbal del ojo no lesionado, o menos lesionado, al más severamente dañado. Las lesiones provocadas por la toma de tejido curan rápidamente y no se observan cambios refractivos, inflamaciones crónicas, defectos epiteliales persistentes, ni neo-vascularizaciones corneales durante el postoperatorio. Previo al procedimiento siempre debería descartarse patología subclínicas que pudiera pasar inadvertida en el momento de la donación y ser motivo de complicaciones futuras (65).
2. *Trasplante de limbo alogénico.* El trasplante de limbo alogénico solo se utiliza cuando el otro ojo del paciente no presenta un buen estado o cuando, por cualquier circunstancia no se considera prudente obtener tejido del ojo contra-lateral. El mismo se obtiene a través de un donante, siendo ideal la donación por parte de un familiar con compatibilidad de grupo sanguíneo. Siempre será deseable encontrar donantes menores de 50 años, ya que así se asegura una mayor cantidad de CM. Por otra parte, invariablemente, es necesario considerar, un tratamiento inmunosupresor sistémico (66).

Trasplante con células madre. Al haberse desarrollado las técnicas para la expansión *in vitro* de las células progenitoras del limbo, ellas se han podido utilizar adecuadamente y eficientemente para el tratamiento de los casos de insuficiencia límbica unilateral, por lo que hoy en día el trasplante con CM es considerado la mejor alternativa terapéutica existente (67). En las investigaciones realizadas para el cultivo de las células del limbo con fines terapéuticos un aspecto crítico ha sido encontrar un soporte para que las células puedan trasplantarse de forma adecuada y segura. Tal soporte es

fundamental, ya que debe ser una matriz apropiada que asegure tanto el soporte como la preservación de las propiedades de las CM. El ambiente creado debe ser óptimo para el crecimiento, ya que se debe poder producir un número de células activas suficiente a partir de la pequeña muestra del tejido donante, lo cual permitirá que tanto la caracterización como el mantenimiento de las propiedades de las células limbales cultivadas puedan usarse para cumplir con el objetivo de reconstruir adecuadamente la superficie ocular (68).

Para desarrollar una matriz de soporte más eficiente se han realizado diversos estudios utilizando, entre otros, diversos tipos de geles, así como fibronectina y colágeno, pero los resultados obtenidos han sido limitados (69). Igualmente se han reportado el uso de soportes sintéticos realizados con polímeros, los cuales han causado fuertes procesos inflamatorios, y han presentado problemas para su degradación (70). Una novedad en cuanto a una matriz de soporte, es la utilización de un lente de contacto sobre el cual se cultiva un fragmento de limbo para posteriormente colocarlo en la superficie ocular afectada. Este procedimiento, por los resultados alcanzados con los primeros ensayos que reportan la recuperación visual de los pacientes tratados, deben ser confirmados y con el tiempo será determinada su efectividad, que bien pudiera ser exitosa o no conveniente a largo plazo (71).

Síndrome limbal y matriz de fibrina.

El éxito de las técnicas de ingeniería de tejidos reposan en crear las condiciones óptimas *in vitro* para el mantenimiento y diferenciación de las CM, donde destaca el papel que juega la matriz de soporte para su cultivo (72). Como ya se mencionó, la membrana amniótica ha sido la más utilizada como soporte para la expansión de las CML, pero ahora también se está recurrido a la fibrina como matriz suplente de la matriz extracelular, la cual tiene las siguientes

ventajas: (a) es un sistema natural que participa en la reparación de heridas; (b) puede ser reabsorbida *in vivo*; (c) posee escasa antigenicidad, por lo que no desencadena rechazo inmunológico; (d) prolonga la supervivencia y capacidad de clonación de las CM; (e) promueve la diferenciación de las células epiteliales; (g) tiene propiedades antibacterianas; (h) inhibe la angiogénesis (73-76).

Se han publicado múltiples trabajos sobre la utilización de la fibrina como soporte, destacando el trabajo pionero de Pellegrini y col. (77), quienes reportaron resultados exitosos de pacientes con patología unilateral de la superficie ocular tratados con CM obtenidos de biopsias epiteliales oculares cultivadas sobre una matriz de fibrina. Posteriormente han aparecido un gran número de publicaciones con trabajos donde se ha evaluado el efecto de diferentes variables con la finalidad de establecer las condiciones óptimas y favorables para preservar la expresión del fenotipo en las CM, destacándose diferentes medios nutritivos de cultivo, métodos de disociación, selección de ciertas regiones del limbo, crecimiento clonal, edad del donante etc. Ello ha llevado a optimizar la metodología para la expansión y mantenimiento de las células indiferenciadas, bien sea para su aplicación terapéutica inmediata o futura para conseguir la regeneración del epitelio de la córnea. Hay trabajos en los cuales, además del soporte de fibrina, se han añadido a la matriz otros componentes, destacando el uso de las células 3T3 para que actúen como capa de alimentación, bien conocidas como *feeder layer* o *nurse cells*. También se han probado diferentes concentraciones de suero y factores de crecimiento, como los EGF, TGF α y KGF, los cuales promueven y estimulan el crecimiento clonal y mantienen el fenotipo de las CM durante todo el proceso de cultivo (68, 78-80).

Por otra parte, también se han realizado trasplantes de CML obtenidas a partir de

las células multipotentes que se encuentran en la mucosa bucal de todas las personas, pudiéndolo hacer, por tanto, de los pacientes con deficiencia límbica (81). Nishide y colaboradores obtuvieron resultados positivos con trasplante de células obtenidas de la mucosa bucal autóloga en el caso de deficiencia límbica de ambos ojos, para lo cual no se hizo necesario aplicar un tratamiento con inmunosupresores (82). Pacientes con queratitis corneales fueron tratados con células de la mucosa bucal autóloga y mostraron una re-epitelización y reducción del proceso de la inflamación en la zona ocular (83). Se compararon además, células del epitelio bucal con células epiteliales límbicas, las cuales morfológicamente expresaron marcadores similares tales como p63, ABCG2, la isoforma de p63 (Np63) y Mucina 1,4,16 (84). A pesar de las limitaciones existentes, como lo es no conocer definitivamente la presencia de un marcador específico que caracterice a las células del limbo, así como no conocer todavía, profundamente el funcionamiento y microambiente que rodea a las CML, esto no ha sido un impedimento para el desarrollo y aplicación de esta técnica.

CONCLUSIÓN

La insuficiencia limbal, problema de salud de singular importancia, puede ser invalidante para el paciente que lo sufra, teniendo consecuencias personales, sociales y económicas notables. Esta revisión pone de manifiesto la importancia de esta patología por lo que se revisó y evaluó tanto la biología de la córnea como la génesis, el manejo y los diferentes tratamientos que se ha utilizado para su solución clínica. En la actualidad las técnicas más utilizadas para tratarla están siendo sustituidas por los nuevos desarrollos realizados mediante la ingeniería de tejidos, los cuales tienen múltiples ventajas, destacando la eliminación de los ries-

gos de rechazo, disminución del tiempo de tratamiento y reducción de los costos. Es innegable que las células limbales en cultivo han hecho posible crear técnicas cada vez más perfeccionadas y seguras, por lo que consideramos que con ellas se podrá controlar y curar eficientemente la insuficiencia limbal.

REFERENCIAS

1. **Daniels J, Dart J, Tuft S.** Corneal stem cells in review. *The Wound Healing Society* 2001; 9:483-494.
2. **Katz M.** The human eye as an optical system. Tasman W, Jaeger E. editors. *Duane's clinical ophthalmology*, vol. 1, Philadelphia 1989, JB Lippincott Co.
3. **Thoft R, Friend J.** The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1442-1443.
4. **Lavker R, Dong G, Cheng S, Kudoh K, Cotsarelis G, Sun T.** Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 1864-1875.
5. **Schlotzer-Schrehardt U, Kruse F.** Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005; 81:247-264.
6. **Li W, Hayashida Y, Chen Y, Tseng S.** Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007; 17: 26-36.
7. **Stepp M, Zieske J.** The corneal epithelial stem cell niche. *Ocul Surf* 2005; 3:15-26.
8. **Krenser K, Freddo T.** Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 142-152.
9. **Wei Z, Lin T, Sun T, Lavker R.** Clonal analysis of the in vivo differentiation potential of keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:753-761.
10. **Meller D, Dabul V, Tseng S.** Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res* 2002; 74: 537-545.
11. **Gipson I.** The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye* 1989; 3: 132-140.
12. **Lavker R, Tseng S, Sun T.** Corneal epithelial stem cells at the limbos: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004; 78: 433-446.
13. **Jackson K, Mi T, Goodell M.** Hematopoietic potential of stem cell isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14482-14486.
14. **Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L.** Identification of the haematopoietic stem cell niche and control niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.
15. **Barrandon Y, Green H.** Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2302-2306.
16. **Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondanza S, Guerra I, Zambruno G, Micali G, De Luca M.** The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation* 1999; 68: 868-879.
17. **Dua H, Azuara-Blanco A.** Limbal stem cell of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44: 415-425.
18. **Lehrer M, Sun T, Lavker R.** Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998; 111: 2867-2875.
19. **Schermer A, Galván S, Sun T.** Differentiation related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggest limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103: 49-62.
20. **Boulton M, Albon J.** Stem cell in the eye. *Int J Biochem Biol* 2004; 36: 643-657.
21. **Notara M, Shortt A, Galatowicz C, Calder V, Daniels J.** IL6 and the human limbal cell niche: a mediator of epithelial-stromal interaction. *Stem Cell Res* 2010; 5: 188-200.
22. **Bishop A, Buttery L, Polak J.** Embryonic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 424-429.
23. **Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K.**

- The use of human mesenchymal stem cell derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis* 2009; 50: 2109-2115.
24. **Ainseough S, Linn M, Barnard Z, Schwab I, Harkin D.** Effects of fibroblast origin and phenotype on the proliferative potential of limbal epithelial progenitor cells. *Exp Eye Res* 2011; 92: 10-19.
 25. **Schlotzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse F.** Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 2007; 85: 845-860.
 26. **Dua H, Shanmuganathan V, Powel-Richards A, Tighe P, Joseph A.** Limbal epithelial crypts: A novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 529-532.
 27. **Li D, Tseng S.** Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995; 163: 61-79.
 28. **Li D, Tseng S.** Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/ scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblast. *J Cell Physiol* 1997; 172: 361-372.
 29. **Cheng C, Wang D, Kao M, Chen J.** The growth promoting effect of KGF on limbal epithelial cells is mediated by up regulation of delta N p63 alpha through the p32 pathway. *J Cell Sci* 2009; 122: 4473-4480.
 30. **Yanai R, Yamada N, Kugimiya N, Inui M, Nishida T.** Mitogenic and antiapoptotic effects of various growth factors on human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2122-2126.
 31. **Ordonez P, Di Girolamo N.** Limbal Epithelial Stem cell: Role of the niche Microenvironment. *Stem Cells* 2012; 30: 100-107.
 32. **Huang A, Tseng S.** Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 96-105.
 33. **Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O.** p63 identifies keratinocyte Stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 156-161.
 34. **Salehi-Had H, Alvarenga L, Isseroff R, Schwab I.** Factors modulating p63 expression in cultured limbal epithelial cells. *Cornea* 2005; 24: 845-852.
 35. **Yang A, Kaghad M, Wang Y.** p63 a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating death inducing and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2: 305-316.
 36. **Di Iorio E, Barbaro V, Ferrari S.** Q-FIHC: quantification of fluorescence immunohistochemistry to analyse p63 isoforms and cell cycle phases in human limbal stem cells. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 983-991.
 37. **Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M.** Isoforms of Delta Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9523-952.
 38. **Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M.** Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res.* 2007; 85:845-860.
 39. **Harbin D, Barnard Z, Gillies P, Ainseough S, Apel A.** Análisis of p63 and cytokeratin expresión in a cultivated limbal autograft used in the treatment of limbal cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 1154-1158.
 40. **Raeder S, Utheim T, Utheim O, Cai Y, Roald B, Lyberg T, Kjeldsen-Kragh J, Ramstad H, Messelt E, Nicolaisen B.** Effect of limbal explant orientation on the histology, phenotype, ultrastructure and barrier function of cultured limbal epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2007; 85:377-386.
 41. **Colabelli G, Gisoldi R, Pacobelli A, Villani C, Amato D, Pellegrini G.** Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea* 2010; 29: 715-722.
 42. **Kawasaki S, Tanioka K, Yamasaki C, Cannon A, Kinoshita S.** Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res* 2006; 82: 293-299.

43. **De Paiva C, Chen Z, Corrales R, Pflugfelder S, Li D.** ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 63-73.
44. **Kubota M, Shimmura S, Miyashita H, Kawakita T, Tsubota K.** The anti-oxidative role of ABCG2 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 51: 5617-5622.
45. **Grueterich M, Espana E, Tseng S.** Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 63-71.
46. **Seigel G, Sun W, Salvi R, Campell L, Sullivan S, Reidy J.** Human corneal stem cell display functional neuronal properties. *Mol Vis* 2003; 9:159-163.
47. **Touhami A, Grueterich M, Tseng S.** The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane cultura. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 987-994.
48. **Zhao X, Das A, Thoreson W, James J, Wattnem T, Rodríguez-Sierra.** Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors. *Dev Biol* 2002; 250: 317-331.
49. **Puangritharem V, Tseng S.** Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1996; 102: 1476-1485.
50. **Yao YF, Zhang B, Zhou P, Jiang JK.** Autologous limbal grafting combined with deep lamellar keratoplasty in unilateral eye with severe chemical or thermal burn at late stage. *Ophthalmology*. 2002; 109: 2011-2017.
51. **Tiller A, Odenthal M, Verbraak F, Gortzak-Moorstein N.** The influence of keratoplasty on visual prognosis in aniridia: a historical review of one large family. *Cornea* 2003; 22: 105-110.
52. **Tseng S.** Concept and applications of limbal stem cells. *Eye* 1989; 3: 141-157.
53. **Tseng S, Chen S, Shen Y, Chen W, Hu F.** Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cell. *Curr Mol Med* 2010; 10: 841-850.
54. **Mackman G, Brighbill F, Optiz A.** Corneal changes in aniridia. *Am J Ophthalmol* 1979; 87: 497-502.
55. **Nobla A, Loh R, MacLennan S, Pesudova K, Reynolds A, Bridges L, Burr J, Stewar O, Quereshi S.** Comparison of autologous serum eye drop with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular disease. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 647-652.
56. **Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM.** Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 15: 88-99.
57. **Tseng S, Espana E, Kawakita T.** How does amniotic membrane work? *The Ocular Surface* 2004; 2: 177-187.
58. **Giasson C, Bouchard C, Boisjoly H, Germain L.** Amnios et problèmes de surface oculaire. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 639-644.
59. **López García J, Rivas L, García Lozano I.** Trasplante de membrana amniótica en el tratamiento de la insuficiencia limbal moderada de pacientes con aniridia congénita. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005; 80: 517-524.
60. **Auw-Haedrich C, Agranai M, Gabber T, Meyer P, Arnold N, Reinhard T.** Immunohistochemical expression of epithelial cell markers in corneas with congenital aniridia and ocular cicatrizing pemphigoid. *Acta Ophthalmol* 2011; 89: 47-53.
61. **Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K.** Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; 109:1285-1290.
62. **Kum Kim M, Jae Lim I, Joo Youn O, Mi Sun S, Kyeong Seon S, Won Ryang W.** Efficient cultivation conditions for human limbal epithelial cells. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 864-869.
63. **Yang X, Moldovan N, Zhao Q, Mi S, Zhou Z Chen D.** Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis* 2008; 14: 1064-1074.

64. **Kenyon K, Tseng S.** Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96: 709-723.
65. **Dua H, Forrester J.** The corneo-scleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol.* 1990; 110: 646-656.
66. **De Luca M, Pellegrini G, Green H.** Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regen Med* 2006; 1: 45-57.
67. **Sangwan V, Matalia H, Vemuganti G.** Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol.* 2006; 54: 29-34.
68. **Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G.** Limbal Stem-Cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010; 363:147-155.
69. **He Y, Alizadeh H, Kinoshita K, McCulley J.** Experimental transplantation of cultured human limbal and amniotic epithelial cells onto the corneal surface. *Cornea* 1999; 18: 570-579.
70. **Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K, Coroneo M, Wakefield D, Watson S.** A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009; 87: 1571-1578.
71. **Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio J.** Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 2008; 26: 570-579.
72. **Echevarria T, Di Girolamo N.** Tissue regenerating vision-restoring corneal epithelial stem cells. *Stem Cell Rev* 2011; 2: 256-268.
73. **Mee K, Jae L, Joo Y, Mi S, Kyeong S, Won R.** Efficient cultivation conditions for human limbal epithelial cells. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 864-869.
74. **Yang X, Moldovan N, Zhao Q, Mi S, Zhou Z, Chen D.** Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Molecular Vision* 2008; 14: 1064-1074.
75. **Tsai R, Li L, Chen J.** Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343: 86-93.
76. **Tsai RJ, Tsai RY.** ExVivo expansion of corneal stem cells on amniotic membrane and their outcome. *Eye Contact Lens* 2010, 36: 305-309.
77. **Pellegrini G, Traverso C, Franzi A, Zingrari M, Cancedda R, De Luca M.** Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1977; 349: 990-993.
78. **Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, Pellegrini G.** Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001; 72: 1478-1485.
79. **Meyer-Blazejewska E, Kruse F, Bitterer K, Meyer C, Hofmann-Rummelt C, Wunsch P, Schlötzer-Schreberdt S.** Preservation of the limbal stem cell phenotype by appropriate culture techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:765-774.
80. **Nassiri N, Pandya H, Djalilian A.** Limbal allograft transplantation using fibrin glue. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 218-222.
81. **Nakamura T, Kinoshita S.** Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 2003; 22: 75-80.
82. **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Edachi E.** Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351: 1187-1196.
83. **Ma D, Kuo M, Tsay Y, Chen H, Chen X, Wang L, Li L, Hsiao C, Lin K.** Transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn. *Eye* 23; 2009: 1442-1450.
84. **Krishnan S, Iyer G, KrishnaKumar S.** Culture and characterization of limbal epithelial cells oral mucosal cells. *Indian J Med Res* 2010; 131: 422-428.