



Generación de Córneas por Bioingeniería con xenotransplantes y queratocitos humanos

Álvaro Ríos Rodríguez, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada



1 - Propósito

La córnea es el elemento más importante en la función visual proporcionando el poder refractor de los diferentes elementos del ojo. Esta propiedad es debida a la organización, estructura transparente del estroma corneal, el cual es esencial para el funcionamiento visual adecuado. Incluso, la córnea es una barrera que protege a los elementos internos del ojo de las agresiones del ambiente externo

Hay numerosas enfermedades que pueden afectar a este altamente organizada estructura, que pueden tornar opaca a la córnea, provocar una incapacidad visual o incluso ceguera. Debemos saber que el único tratamiento hasta el momento de la mayoría de estas enfermedades es un trasplante de córnea.

Hay dos grandes desventajas: rechazo y la poca cantidad de donantes. Por lo tanto, desde un punto de vista clínico sería muy útil general un sustituto corneal para la córnea humana

Uno de los límites principales para los xenotransplantes en humanos es la existencia de anticuerpos naturales para el epítipo de la α 1,3 galactosa terminal que se expresa en la membrana celular de todos los mamíferos exceptuando al humano y a los primates del viejo mundo. Provocan el rechazo.

Idealmente, un buen protocolo de decelularización deber ser capaz de cumplir un criterio de cuatro reglas:

- 1.- Eficiencia de la decelularización, quiere decir, una eliminación de todas las células y restos celulares del xenotransplante
- 2.- Eliminación adecuada de todos los epítipos de la α -galactosa.
- 3.- Posibilidad de recelularización del tejido decelularizado usando células del huésped.
- 4.- Buen comportamiento óptico de las córneas decelularizadas.

La transparencia de la córnea es altamente dependiente de dos grandes factores: La estructura de la matriz estromal y la forma, tamaño, densidad y estructura de las células corneales

En el presente estudio, se ha optimizado y evaluado dos métodos diferentes de decelularización, usando NaCl y SDS (dodecilsulfato sódico) para determinar cuál de ellos es el mejor para preservar la estructura histológica, composición y óptimo comportamiento óptico de las córneas decelularizadas. Entonces, aquellas

2 - Material y Metodos

Decelularización de córneas porcinas

Se obtienen noventa córneas de cerdos adultos inmediatamente después de su muerte en un matadero local. Los ojos seleccionados para el estudio tienen un superficie corneal íntegra con un diámetro horizontal de 12 a 14 mm. Diez córneas porcinas nativas (NPC o native porcine cornea) son usadas como controles. El tejido epitelial y endotelial corneal fueron retirados usando 4 mg/mL de Dispase II (una proteasa) durante 45 minuto a 37 °C. Fueron posteriormente bañadas con una solución al 10% de antibiótico-antimicótico (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) en PBS (tampón fosfato salino) durante 10 minutos y seguidamente bañadas con PBS.

Se realizan los dos procesos independientes de decelularización: uno usando 1.5 M NaCl (aplicado a 50 córneas) y la otra usando 0.1 % de SDS en PBS (aplicada a 30 córneas). Ambos protocolos fueron llevados a cabo con vibración continua (200 rpm) durante 12 horas en una sala a temperatura ambiente. Posteriormente a esto, las córneas porcinas acelulares (APC o acellular porcine corneas) son lavadas tres veces con PBS durante 30 minutos con continua vibración (200 rpm).

Obtención de queratocitos humanos

Son obtenidas en el Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, España). Queratocitos del estroma son aislados de fragmentos de estroma corneal que permanecían atados al limbo esclerocorneal. Todas las células son incubadas a 37 °C con un 5% de CO₂ bajo condiciones de cultivo estándar. (Para obtener las córneas con fines de investigación hubo consentimientos escritos de los representantes legales de los donantes de acuerdo a los protocolos establecidos por la Organización Nacional Española de Trasplantes Humanos (ONT)

Recelularización de las APCs

Son sembrados 200.000 queratocitos humanos en la superficie corneal a temperatura ambiente. Después de 2 horas, las corneas están completamente sumergidas en DMEMs en un radio de masa de 20:1. Todas las córneas recelularizadas (RCS) son incubadas a 37 °C en 5% de dióxido de carbono bajo las condiciones estándar durante 14 días. Este proceso solo se realizó con las APCs decelularizadas con el protocolo más eficaz en preservar la estructura original de la córnea nativa (córneas que han sido decelularizadas on NaCl)

Evaluación histológica y de fluorescencia inmunohistoquímica

Las córneas son fijadas con 4% de formaldehído, deshidratadas en la serie de etanol y embebida en

córneas decelularizadas que muestren un mejor comportamiento en base a los resultados será recelularizadas con queratocitos humanos y evaluadas en los niveles histológicos, bioquímicos y ópticos para su uso en la medicina regenerativa

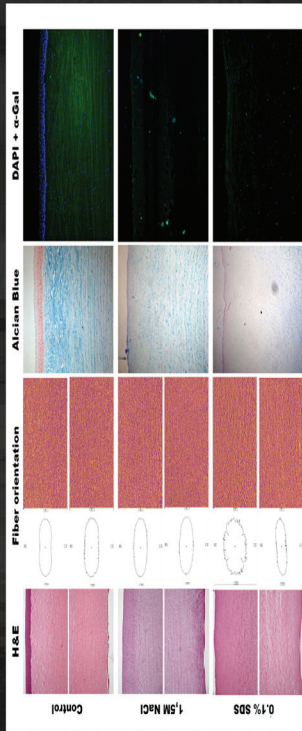
3- Resultados

Evaluación de las APCs decelularizada con los protocolos de SDS y NaCl

El nivel de transparencia de las córneas decelularizadas con NaCl es similar a las NPC control. Las tratadas con SDS muestran aparentemente unos niveles menores que los otros tipos. Ambos métodos son válidos para eliminar todas las células presentes, a pesar de que hay algunos restos nucleares en ambos casos. La eficacia de ambos métodos es diferente y las APCs tratadas con SDS muestran un nivel menos de restos nucleares comparándolo con las APCs tratadas con NaCl. Aunque el estroma en las tratadas con SDS estaba más desorganizado que las APCs tratadas con NaCl y las NPCs. Ambas decelularizaciones mantenían la presencia e integridad de la membrana de Bowman y la membrana de Descemet. La orientación de la fibra en las APCs tratadas con NaCl era muy similar a las de NPCs mientras que es al contrario con las tratadas con SDS.

La tinción con azul Alcian muestra que los proteoglicanos están distribuidos a través de las NPCs, con un incremento de concentración en la parte más anterior del estroma. Las APCs tratadas con NaCl presentan una intensidad comparable a las NPCs, aunque menor. Las SDS muestran muy poca intensidad. La mayoría del estroma de las tratadas con SDS no muestran proteoglicanos.

El análisis de inmunofluorescencia de la expresión del epítipo de alpha-galactosas muestran expresión en las NPCs pero no en las dos decelularizadas. Se realizó también un análisis de propiedades ópticas.



Eficacia de recelularización

Se demuestra que es posible que los queratocitos humanos migren y se expandan en el estroma corneal decelularizado con NaCl. Los resultados son confirmados por fluorescencia DAPI. El número de células en las APCs recelularizadas es comparable a las NPCs control, a pesar de que estas están con una organización menor. Los queratocitos expresan unos niveles altos de ALDH1 (un marcador natural de los queratocitos) después de 3 semanas en cultivo como demuestra la inmunofluorescencia. Análisis ópticos revelan que la transmitancia de las RCs es muy similar a las NPCs control. Y esta transmitancia aumentado las córneas son recelularizadas, por lo que las células juegan un importante papel.

paramétrica. Se realizan cortes de 4 micrómetros de espesor y son teñidas con nemiatoxina-eosina y azul Alcian. Son observadas por microscopio óptico. La expresión del epítipo de la alpha-gal y de la aldehído deshidrogenasa I (ALDH1) es determinada mediante fluorescencia inmunohistoquímica usando secciones tisulares correspondientes a NPCs, APCs y RCs. Para determinar la eficiencia de la decelularización y la recelularización se obtienen imágenes histológicas correspondientes a cada tipo El número de restos nucleares que quedan (60 córneas decelularizadas: 30 tratadas con NaCl y 30 tratadas con SDS) y el número de queratocitos (20 córneas recelularizadas) fueron determinadas usando un software de detección automática.

Análisis de la orientación de la fibra y caracterización de la superficie

Fue realizado por el plug-in de tasación de superficie Surf-Charfj ImageJ. Permite el cálculo de la orientación de la estructura basado en el vector resultante formado por las fibras.

Evaluación de las propiedades ópticas de las córneas.

Es usado un espectroradiómetro con una precisión del 4%. Para las medidas las muestras estaban situadas sobre un fondo en blanco y negro. (1) NPC, (2) 1.5M NaCl y (3) 0.1% SDS.



Conclusión

La generación de córneas artificiales basadas en métodos de decelularización deberían cumplir todos los requisitos que incluye una córnea humana normal: biocompatibilidad, aceptación inmunológica, integridad mecánica y transparencia óptica. También deben dar un entorno favorecedor a las células epiteliales y del estroma para que migren y repueblen el tejido, tanto in vitro como in vivo. La mayoría de requerimientos dependen de la perfecta organización de la estructura del estroma corneal, muy difícil de imitar en laboratorio. También la eliminación de los epítipos de la alpha-gal para evitar el rechazo.

Los resultados sugieren que el tratamiento con NaCl en las córneas porcinas generan buenos resultados, con una distribución y orientación de las fibras muy similar a las del NPCs control. La recelularización de una córnea decelularizada es un paso muy importante en el desarrollo de córneas humanas sustitutas en laboratorio

Finalmente, los resultados nos indican que el tratamiento con 1.5M NaCl general un estroma corneal acelarar con propiedades histológicas y ópticas adecuadas, ofreciendo un microambiente para los queratocitos humanos. Estos sustitutos tienen un potencial terapéutico muy potente. APCs podrían ser generadas para reparar distintos defectos en las córneas así como para tratar distintos tipos de enfermedades relacionadas con ellas.

A la derecha se puede observar el buen comportamiento de ambas córneas decelularizadas con respecto a las NPCs control

