

I. Alan Uribe Santa María¹; Dr. Raúl Rosales Ibáñez²; Mtra. Josefina Vazquez Medrano³; Dr. Alonso Reyes⁴; Esp. Oscar Ramos Montes⁵.

¹Carrera de Optometría, UNAM/FESI, ²Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, UNAM/FESI., ³Laboratorio de Fisiología Vegetal y Unidad de Biotecnología y Prototipos, FES Iztacala, UNAM, ⁴Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. ⁵Jefatura de Optometría, FESI/UNAM.

INTRODUCCIÓN

La córnea puede ser lesionada por varias enfermedades que conducen a deficiencia visual profunda o ceguera. Para su tratamiento la queratoplastia penetrante sigue siendo la terapia de elección.



Enfermedades de la córnea¹



Ceguera funcional²

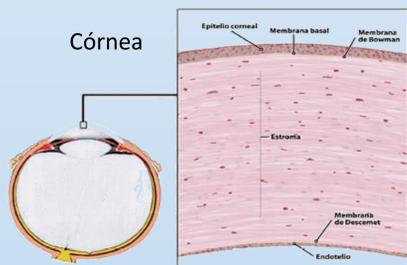


Trasplante corneal³



Escasos de córneas y altos precios⁴

Alternativa: **Córnea bioartificial⁵**
"la construcción de córnea por ingeniería tisular es prometedora, así como un andamio para el tratamiento de ceguera corneal"⁵



Andamio
Es un medio Artificial o natural que proporciona un entorno 3D de adecuado para un desarrollo celular, proliferación y diferenciación con función específica durante procesos de curación o regeneración.^{6,7}

Materiales naturales
Celulosa⁸
Agarosa⁸
Quitosano⁷
Colágeno⁹

Materiales artificiales
Hidrogeles^{7,8}
Policaprolactona (PCL)⁷
Poliétilglicol (PEG)^{7,9}

Descelularización
Procedimiento de lisis o eliminación celular, obteniendo un medio libre de componente inmunológico, preservando únicamente la estructura o matriz extracelular. Se obtiene con diferentes métodos.¹⁰

Métodos biológicos
- Tripsina¹¹

M. Químicos
- Tritón X-100¹²
- Cloruro de Sodio¹³

M. Físicos
- Agitación¹⁴
- Congelación/Descongelación¹⁴
- Perfusión, Calor seco¹⁵
- Alta presión hidrostática¹⁵

Antecedentes

1. Córnea de porcino tratada en NaCl x 30 min. con agitación y tritón X100 0,2%, con deshidratación con glicerol.¹⁶
R= (H&E) Eliminación de células corneales completa con disposición de fibras de colágeno ordenadas y estructura laminar compacta, regular y paralela.

2. Universidad de Shandong, China. Solución tratada con SDS 0,5%.¹⁷
R= Estado difuso y turbidez.

Ausencia de células y materiales nucleares en el andamio, conservando la claridad óptica, resistencia a soportar procedimientos quirúrgicos y buena biocompatibilidad.

3. Xian-Ning¹⁸; córnea de avestruz, tratada con solución salina con 20% de NaCl (p/v) por 48hr. Combinado con un método de tripsina al 0,13% por 48hr.

R= Conservación de la microestructura y las propiedades biomecánicas adecuadas para el andamio corneal. Posteriormente tubo efecto proliferativo positivo al cultivar células.

Objetivo

Obtener un andamio/matriz-extracelular derivado de córnea acelular de avestruz mediante la aplicación de detergentes.

Objetivos específicos

1. Obtener córneas de Avestruz.
2. Probar diferentes métodos/tratamientos para la eliminación celular de la córnea.
3. Evaluar la descelularización por medio de técnicas histológicas.
4. Analizar la disposición de las fibras de colágeno por microscopía (SEM, TEM, AFM).

Hipótesis

El uso del detergente sobre las córneas ocasionará una descelularización parcial o total y una matriz extracelular conservada.

METODOLOGÍA

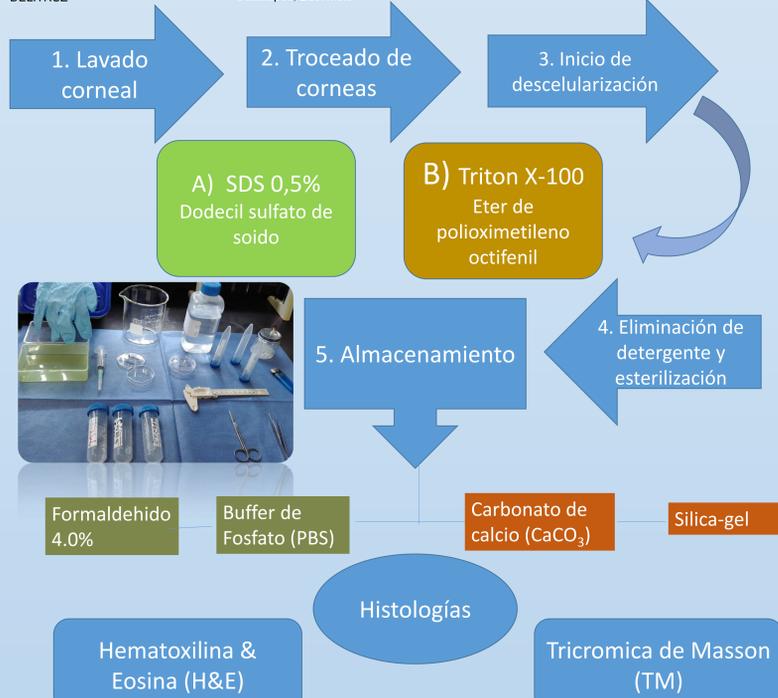


Avestruz 1.5 años 17/07/2017 DELITRUZ



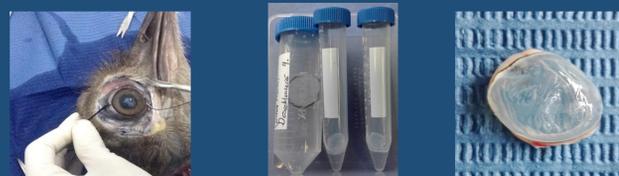
28/08/2017 Lab. Ing. Tisular Coahuetepec, Edo. Mex.

Compuestos de preparación de PBS (buffer de fosfato)	Concentración de consulta o concentración isotónica.	Gramos utilizados en 1 litro.
1. KH ₂ PO ₄ (ácido) Fosfato de potasio monobásico (Sigma P. code 1002144434)	1.8mM	0.24gr.
1. Na ₂ HPO ₄ (base) Fosfato de sodio dibásico anhidro (Sigma P. code)	10mM	1.44gr.
1. KCl Cloruro de potasio (Sigma P. code 3911500G)	2.7mM	0.2gr.
1. NaCl Cloruro de sodio (Vertec Cod. V000106)	137mM	8gr.
1. MgCl ₂ Cloruro de magnesio (Sigma 110H0782)	0.5mM	0.10gr.
1. CaCl ₂ Cloruro de calcio (Sigma 100H0783)	1mM	0.133gr.



RESULTADOS

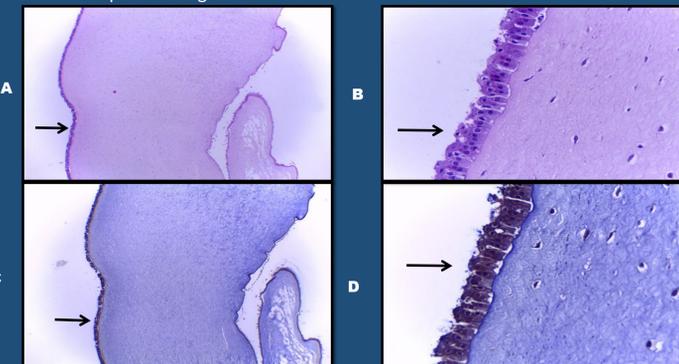
1. Se obtuvieron córneas de avestruz preservando la integridad corneal.



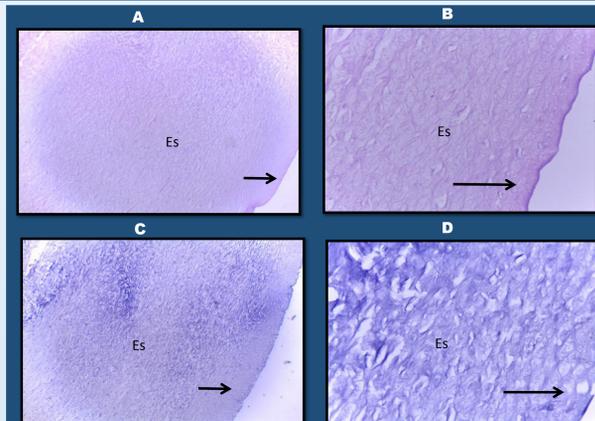
2. Se probaron diferentes métodos para la eliminación celular de la córnea.



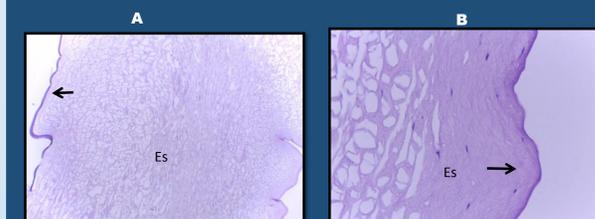
3. Evaluación por histologías



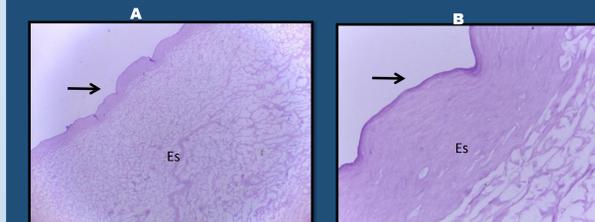
Córnea nativa de avestruz. Es, estroma corneal; flecha, epitelio corneal. A y B: Hematoxilina y Eosina. C y D: Tricrómica de Masson.



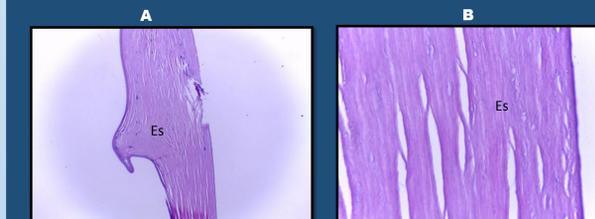
Córnea de avestruz Tritón X-100, almacenamiento directo en Formaldehído, fibras de colágeno que componen al estroma corneal (resaltado en azul mediante la tinción Tricrómica de Masson). No se observa celularidad en ninguno de los estratos.



Córnea de avestruz SDS almacenada en silica-gel, se aprecia fibras de colágeno compactas y paralelas, con presencia de células.



Córnea de avestruz Tritón X-100 almacenada con PBS, se aprecia fibras de colágeno alteradas con pérdida ligera de morfología del estroma. No se observa celularidad en ninguno de los estratos.



Córnea de avestruz Tritón X-100 almacenada en silica-gel, se aprecia fibras de colágeno compactas y paralelas, sin presencia de células.

Discusión

- Al día de hoy se reporta pocas investigaciones con córneas de avestruz
- Autores después del método descelularizante obtienen una opacificación total y es recuperada la transparencia con glicerol al 100% durante 30min.¹⁷ por lo tanto hemos considerado apoyarnos en esa técnica (Kupeng Pang, 2016).
- La presente investigación concuerda con Ju Zhang, empleando el método de SDS al 0,5%, permite la preservación de la matriz extracelular con **eliminación celular total**.

Conclusiones

- Se obtuvieron 2 tipos de descelularizados (SDS y Tritón X-100).
- El detergente Tritón X-100 resulta un **método óptimo** a diferencia del SDS.
- El detergente SDS produce un **grado mayor de opacidad** por lo que es conveniente utilizar Tritón X-100.
- El método de conservación Silica-Gel es un **mejor método de almacenamiento**.

Retos

- ☐ Utilización del andamio una vez repoblado de células como **sustituto de trasplante corneal en ensayos preclínicos. (conejos)**
- ☐ Promover el **desarrollo de aplicaciones clínicas de córneas acelulares en la ingeniería tisular y medicina regenerativa.**

1. Furtado JM, Lansingh VC, C. M. (2012). Causes of blindness and visual impairment in latin america. *Surv Ophthalmol*, 149-77.
2. Whitcher JP, S. M. (2001). Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*, 79(3), 214-21.
3. Borderie VM, B. P. (2009). Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology*, 116(12) 2354-2360.
4. <http://balancetrack.org/home/highcostservices/index.html>
5. Carlsson D. L. F. (2003). Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(26):15346-15351.
6. Jose A. Sanz-Herrera, E. R.-R. (2011). Cell-biomaterial mechanical interaction in the framework of tissue engineering: Insights, computational modeling and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 8217-8244.
7. Atul A. Chaudhari, K. V. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int J Mol Sci*, 17(12), 1974.
8. Miguel Alaminos, M. d.-A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a Fibrin-Agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47:3311-3317.
9. Reichl S. M.-G. C. (2003). The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing betanulol hydrochloride. *Int J Pharm*, 250:191-201.
10. Carro, J. R. (2014). *Desarrollo y análisis de un protocolo de descelularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares*. León: Universidad de León.
11. Liu, X.-N. (2016). Acellular ostrich corneal stroma used as scaffold for construction of tissue-engineered cornea. *Int J Ophthalmol*, 9(3):325-331.
12. Yu BT, L. W. (2013). Comparative study of the Tritón X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 1(6):2179-84.
13. Xie Yun Ma, Y. Z. (2015). Corneal Stroma Regeneration with Acellular Corneal Stroma Sheets and Keratocytes in a Rabbit Model. *PLoS One*, 10(7): e0132705.
14. Gilbert TW, S. T. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 19(19):3675-83.
15. Yoshihide Hashimoto, S. H. (2016). Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. *Scientific reports*, 1-9.
16. Hailiang Luo, Y. L. (2013). Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burns. *Biomaterials*, 67:48-6757.
17. Kupeng Pang, L. D. (2016). Three-Dimensional Construction of a Rabbit Anterior Corneal Replacement for Lamellar Keratoplasty. *PLoS One*, 11(12):e0168084.