



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y ACTIVIDAD DE
QUERATOCITOS CULTIVADOS DENTRO DE ESTROMAS
CORNEALES DESVITALIZADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

LUISA WENDOLYNE LARA DÍAZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA
ENRÍQUEZ
CIUDAD UNIVERSITARIA,
CD.MX. 2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Lara
Díaz
Luisa Wendolyne
5534102106
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308550144
2. Datos del tutor
M. en C.
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Katia
Jarquín
Yáñez
6. Datos del sinodal 5
Dra.
Maricela
Villagrán
Santa Cruz
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de la proliferación y actividad de queratocitos cultivados dentro de estromas corneales desvitalizados.
89p
2018

A mi familia, porque son lo más importante que tengo y porque sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí. A mis papás, Martha y Luis, gracias por su apoyo incondicional, por su cariño, sus consejos y por sus regaños, poner mi educación siempre como una prioridad, por inculcarme el sentido de la responsabilidad y porque gracias a ustedes soy lo que soy. A mis hermanas, Tania y Mariana, por ser mi ejemplo a seguir, por su ayuda, por sus consejos, por todas las noches de desvelo en las que convirtieron mis proyectos escolares en sus proyectos, gracias por cuidarme y guiarme.

A mis amigas Fer y Ale, gracias por recorrer este camino conmigo, por las pláticas, las risas y los consejos, porque el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A Beto, Marco, Paul y Ely, gracias por su amistad y por todos los momentos inolvidables que compartimos en la carrera.

AGRADECIMIENTOS

Al comité revisor de esta tesis:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Dra. Rosario Ortiz Hernández
- M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz
- Dra. Katia Jarquín Yáñez

Por su tutoría y asesoría técnica:

- Dra. Gabriela Piñón Zárate
- Biól. Beatriz Hernández Téllez
- Biól. María Fernanda Reyes Riquelme
- Biól. Alejandra Rodríguez Oseguera
- Ing. Biomédica Yolanda Gabriela Cano Ramírez

Por su apoyo en la realización de cortes histológicos y tiniones:

- Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS..... | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1Córnea..... | 5 |
| 1.1.2 Características generales | 5 |
| 1.1.3 Estructura microscópica | 7 |
| Epitelio anterior..... | 7 |
| Membrana de Bowman | 10 |
| Estroma | 11 |
| Colágenos..... | 12 |
| Proteoglicanos | 16 |
| Queratocitos | 20 |
| Respuesta de los queratocitos a la lesión de la córnea | 21 |
| Muerte celular de los queratocitos | 21 |
| Transición de los queratocitos a un fenotipo "activado" | 22 |
| Transición al fenotipo de miofibroblastos | 24 |
| Membrana de Descemet..... | 25 |
| Endotelio | 26 |
| Inervación..... | 29 |
| 1.2 Enfermedades corneales | 30 |
| 1.3 Trasplante de córnea | 33 |
| Rechazo corneal..... | 36 |
| 1. 4 Ingeniería de tejidos | 39 |
| Enfoques basados en células..... | 40 |
| Enfoques basados en andamios..... | 41 |
| Estroma corneal descelularizado | 44 |
| Métodos de descelularización | 47 |
| Métodos físicos | 47 |
| Métodos químicos | 48 |

| | | |
|-------|--|----|
| | Ácidos y bases | 48 |
| | Detergentes | 48 |
| | Tratamientos hipotónicos e hipertónicos | 49 |
| | Agentes quelantes..... | 49 |
| | Métodos biológicos..... | 49 |
| II. | ANTECEDENTES | 50 |
| III. | JUSTIFICACIÓN | 53 |
| IV. | HIPÓTESIS | 54 |
| V. | OBJETIVOS..... | 54 |
| | 5.1 OBJETIVO GENERAL..... | 54 |
| | 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES | 54 |
| VI. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 55 |
| | 6.1 Obtención del andamio | 55 |
| | Análisis histológico e inmunohistoquímico del andamio | 56 |
| | Tinción con HyE | 56 |
| | Inmunohistoquímica anti α -gal..... | 56 |
| | 6.2 Aislamiento de células estromales corneales..... | 57 |
| | 6.3 Cultivo de queratocitos en monocapa..... | 58 |
| | Análisis del fenotipo de los queratocitos en cultivo en monocapa..... | 58 |
| | 6.4 Cultivo sobre el andamio desvitalizado | 59 |
| | Esterilización del andamio..... | 59 |
| | Siembra de queratocitos en el andamio | 60 |
| | Evaluación de la proliferación y viabilidad celular | 61 |
| | Ensayo de viabilidad celular con calceína y homodímero de etidio..... | 61 |
| | Evaluación del fenotipo celular en el andamio | 61 |
| VII. | RESULTADOS | 63 |
| | 7.1 Descelularización del estroma corneal | 63 |
| | 7.2 Aislamiento de queratocitos | 66 |
| | 7.3 Fenotipo de queratocitos en cultivo en monocapa..... | 66 |
| | 7.4 Viabilidad y proliferación de queratocitos en el estroma descelularizado | 69 |
| | 7.5 Fenotipo de los queratocitos sembrados en el andamio desvitalizado | 70 |
| VIII. | DISCUSIÓN..... | 73 |
| | Obtención del andamio | 73 |

| | |
|---|----|
| Aislamiento de células del estroma corneal..... | 76 |
| Fenotipo de los queratocitos cultivados en monocapa | 77 |
| Viabilidad y proliferación de los queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado de cerdo | 79 |
| Fenotipo de los queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado de cerdo | 81 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 83 |
| X. REFERENCIAS..... | 84 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| α -gal | Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc-R |
| α SMA | Actina alfa de músculo liso |
| Ab | Antibiótico (estreptomina, penicilina y anfotericina β) |
| ALDH1 | Aldehído deshidrogenasa 1 |
| APC | Células presentadoras de antígenos (por sus siglas en inglés) |
| CENATRA | Centro Nacional de Trasplantes |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DS | Dermatán sulfato |
| DMEM | Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco |
| FACIT | Colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| GAG | Glucosaminoglucano |
| HBSS | Solución salina balanceada de Hanks |
| HLA | Antígeno leucocitario humano |
| HS | Heparán sulfato |
| HSPGs | Proteoglicanos de heparán sulfato |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IT | Ingeniería de tejidos |
| KS | Queratán sulfato |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMP | Metaloproteasa de matriz extracelular |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | Solución salina de fosfatos |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PGs | Proteoglicanos |
| QP | Queratoplastia penetrante |
| SDS | Duodecil sulfato de sodio |
| SFB | Suero fetal bovino |

| | |
|--------------|--|
| SIRNT | Sistema Informático del Registro Nacional de Trasplantes |
| SLRPs | Proteoglicanos pequeños ricos en leucina |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante β |
| TKT | Transquetolasa |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |

RESUMEN

La córnea es un tejido transparente altamente especializado ubicado en la superficie anterior del ojo. Proporciona dos tercios de la capacidad refractiva del mismo, mientras actúa como una barrera a los agentes infecciosos y daños mecánicos. Se compone de cinco capas: Epitelio anterior, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Los queratocitos son el principal tipo celular del estroma corneal, encargados de mantener la integridad de esta capa mediante la producción de colágeno, proteoglicanos (lumican y queratocan) y metaloproteasas de matriz extracelular. Los queratocitos se consideran quiescentes pero pueden ser activados después de una lesión, ya sea para sufrir muerte celular en respuesta a la agresión o que pierdan su quiescencia y transiten a fenotipos reparadores. La pérdida irreversible de las cualidades ópticas de la córnea debido a enfermedades o lesiones, resulta en pérdida de la visión permanente y una vez que esto ocurre el trasplante es la opción predominante para corregir la deficiencia visual. Sin embargo, dicho procedimiento tiene sus desventajas como rechazo y escasez de donantes. La ingeniería de tejidos es un área de la medicina regenerativa que permite la creación de equivalentes de tejido a partir de células cultivadas en una matriz extracelular y factores de crecimiento. Así, se ha logrado cultivar células corneales en diferentes tipos de matrices tridimensionales como fibrina, colágeno y polímeros sintéticos, no obstante éstos presentan diversas desventajas como rápida degradación del andamio e inflamación. Por otro lado, los estromas corneales desvitalizados conservan la estructura tridimensional de la matriz extracelular del tejido nativo y las proteínas estructurales y funcionales, no están limitados por la disponibilidad de donantes, permiten eliminar epítomos inmunogénicos como α -gal, además tienen un tamaño y propiedades de refracción similares a la córnea humana por lo que son una alternativa para el desarrollo de un equivalente corneal que pueda ser utilizado como una fuente potencial de xenoinjertos viables para el trasplante de córnea. El objetivo de este estudio fue evaluar la proliferación y actividad de queratocitos cultivados dentro de estromas corneales desvitalizados. La obtención del andamio fue a través de la descelerización de córneas porcinas, a las cuales se analizó la ausencia de células y del epítomo α -gal mediante inmunohistoquímica. Posteriormente se aislaron queratocitos a partir de córneas de cerdos jóvenes, se sembraron en el andamio y se evaluó la proliferación y viabilidad celular, así como la expresión de queratocan, lumican y procolágeno-1. Los resultados de la evaluación del proceso de descelerización evidenciado mediante la tinción fluorescente con DAPI permitieron comprobar la eliminación de núcleos dentro del estroma. El análisis inmunohistoquímico reveló la ausencia del epítomo α -gal. Las células aisladas a partir de córneas porcinas mostraron una morfología dendrítica característica de los queratocitos y mostraron expresión de queratocan y lumican al día 1 y al día 10 de cultivo, además de ser procolágeno-1 negativas, lo que recuerda su carácter de queratocito. Con respecto a la viabilidad celular, se encontraron células vivas dentro del andamio. Así mismo, al evaluar el fenotipo de los queratocitos dentro del andamio, éstos fueron positivos para queratocan y lumican y negativos para procolágeno-1 y ki67. El fenotipo observado en el andamio fue similar al que presentan los queratocitos *in vivo*, donde expresan proteoglicanos corneales, queratocan y lumican, mantienen una producción muy baja de colágeno tipo I y son quiescentes.

ABSTRACT

The cornea is a highly specialized transparent tissue located on the anterior surface of the eye. It provides two thirds of its refractive power, while acting as a barrier to infectious agents and mechanical damage. The cornea consists of five layers: epithelium, Bowman's membrane, stroma, Descemet's membrane and endothelium. Keratocytes are the main cell type of the corneal stroma, responsible for maintaining the integrity of this layer through the production of collagen, proteoglycans (lumican and keratocan) and extracellular matrix metalloproteases. Keratocytes are considered quiescent but can be activated after an injury, either to undergo cell death in response to the aggression or to lose their quiescence and transit to repair phenotypes. The irreversible loss of the optical qualities of the cornea due to diseases or injuries, results in permanent loss of vision and once this happens the keratoplasty is the predominant option to correct the visual deficiency. However, this procedure has its disadvantages as rejection and shortage of donors. Tissue engineering is an area of regenerative medicine that allows the creation of tissue equivalents from cells grown in an extracellular matrix and growth factors. Thus, it has been possible to cultivate corneal cells in different types of three-dimensional matrices such as fibrin, collagen and synthetic polymers, however these have several disadvantages such as rapid scaffold degradation and in some cases inflammation. On the other hand, the devitalized corneal stroma retains the three-dimensional structure of the extracellular matrix of the native tissue and the structural and functional proteins, they are not limited by the availability of donors, they allow to eliminate immunogenic epitopes such as α -gal, they also have a size and properties of refraction similar to the human cornea so they are an alternative for the development of a corneal equivalent that can be used as a potential source of viable xenografts for corneal transplantation. The aim of this study was to evaluate the proliferation and activity of cultured keratocytes within devitalized corneal stromas. The obtaining of the scaffold was through the decellularization of porcine corneas, to which the absence of cells and the α -gal epitope was analyzed by immunohistochemistry. Subsequently, keratocytes were isolated from corneas of young pigs, seeded on the scaffold and cell proliferation and viability were evaluated, as well as the expression of keratocan, lumican and procollagen-1. The results of the fluorescence staining with DAPI to evaluate the decellularization process, allowed to verify the elimination of nuclei within the stroma. Immunohistochemical analysis revealed the absence of the α -gal epitope. Cells isolated from porcine corneas showed a dendritic morphology characteristic of keratocytes and showed keratocan and luminal expression at day 1 and day 10 of culture, besides all cultured cells were procollagen-1 negative, resembling their keratocyte feature. With respect to cell viability, living cells were found within the scaffold. Likewise, when evaluating the phenotype of the keratocytes within the scaffold, they were keratocan⁺, lumican⁺ and procollagen-1⁻, ki67⁻. The cell phenotype observed in the scaffold was similar to the one presented by the keratocytes *in vivo*, where they express corneal proteoglycans, keratocan and lumican, maintain a very low production of collagen type I and are quiescent.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Córnea

La córnea es un tejido transparente avascular altamente especializado ubicado en la superficie anterior del ojo. Actúa como la primera barrera estructural del ojo. Junto con la película lagrimal provee una superficie refractiva anterior adecuada, proporcionando el 75% del poder refractivo del ojo y la transmisión del 90% de la luz azul y el 98% de la luz roja (Shah *et al.*, 2008). Su transparencia es el resultado de diversos factores incluyendo la anatomía y fisiología de sus componentes celulares. La curvatura y transparencia corneal proporcionan el enfoque inicial de la imagen en la retina (DelMonte y Kim, 2011).

Además de sus propiedades ópticas, la córnea también tiene una función protectora importante para el órgano visual. Constituye la primera barrera contra infecciones y daños mecánicos a las estructuras internas del ojo. La posición en la parte anterior del globo ocular la somete al mayor número de interacciones con el entorno que cualquier otra estructura ocular. Está sujeta a agresiones de objetos sólidos, así como a organismos patógenos y ha desarrollado un elaborado arreglo de nervios sensoriales para indicar un peligro inminente (Beuerman y Pedroza, 1996; West-Mays y Dwivedi, 2006).

1.1.2 Características generales

La córnea tiene un índice de refracción de 1.3375 y un radio de curvatura anterior en la porción central de 7.8 mm (la córnea tiene una curvatura diferente del resto de la superficie ocular). En promedio, su diámetro horizontal es de 11.5 mm y su diámetro vertical mide alrededor de 10.5 mm. El espesor corneal central es de aproximadamente 520 μm y aumenta gradualmente hacia la periferia donde puede alcanzar los 650 μm . El tejido estromal corneal es continuo con el tejido conectivo de la túnica fibrosa y comprende 1/6 de la superficie total. Todas estas características hacen a este tejido responsable de las tres cuartas partes de el poder refractivo total del ojo (Ruberti *et al.*, 2011; DelMonte y Kim, 2011; Eghrari *et al.*, 2015).

El limbo esclerocorneal (Figura 1) corresponde al límite entre la córnea y la esclera, es decir, es una zona de transición donde la córnea transparente continúa hacia la esclera opaca. Su borde anterior se puede definir histológicamente como una línea que conecta los extremos

de las membranas de Bowman y Descemet. El borde posterior del limbo es la línea donde el tejido cambia de transparente a opaco (Ehlers y Hjortdal, 2005). En esta región las fibrillas de colágeno son continuas, pero morfológicamente alteradas. A nivel macroscópico, hay algunas características biomecánicamente importantes: 1) una inversión de la curvatura en el limbo que impone importantes cambios estructurales a nivel de la organización de las fibrillas de colágeno locales, 2) hay cuatro músculos externos cuyas líneas de fuerza actúan en el plano del tejido conectivo corneal, afectando potencialmente la arquitectura del colágeno estromal, 3) el aumento en el espesor corneal desde el estroma central a la periferia que también influye en la organización local y el comportamiento biomecánico del tejido (Ruberti *et al.*, 2011).



Figura 1. Corte histológico de la región del limbo esclerocorneal. Se observa una mayor estratificación y una mayor ondulación del epitelio limbar (flecha). Se puede observar el iris (I), el cuerpo ciliar (CC) con los procesos ciliares (PC) y el cristalino (C) Tinción HyE. 4X. Tomada del Atlas Digital del Depto. de Biología Celular y Tisular, Fac Med, UNAM.

1.1.3 Estructura microscópica

La córnea se compone de cinco capas: un epitelio anterior debajo del cual se encuentra una red fibrosa denominada membrana de Bowman. La mayor parte del tejido está constituido por el estroma, una capa central rica en colágeno que comprende cerca del 90% del espesor de la córnea y debajo de éste se encuentra la membrana de Descemet, la cual sostiene la monocapa de células endoteliales que recubren la parte posterior de la córnea (Figura 2) (Meek y Knupp, 2015).

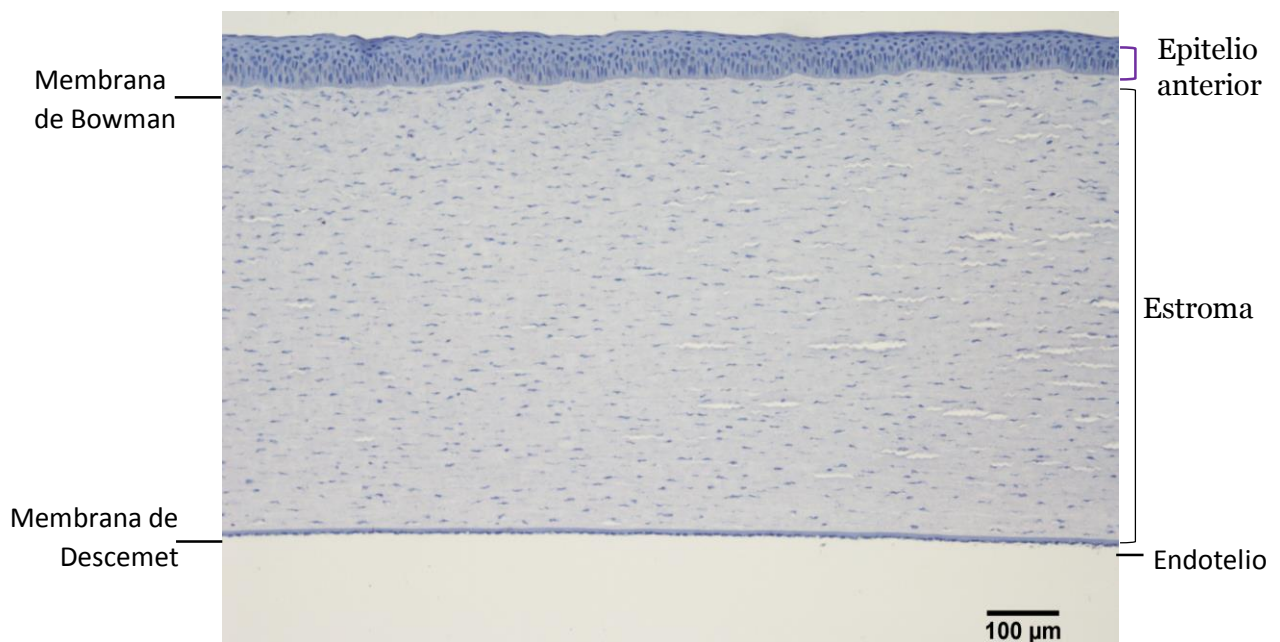


Figura 2. Estructura de la córnea. Imagen histológica de las capas de la córnea. La córnea es una estructura transparente que se encuentra en la superficie anterior del ojo, consta de cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Imagen original de este proyecto. Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, Fac Med, UNAM.

Epitelio anterior

El epitelio anterior constituye la capa más externa de la córnea. Está inmediatamente en contacto con la película lagrimal y forma la primera barrera al entorno exterior. Representa aproximadamente el 8% del espesor corneal total y es un epitelio plano estratificado sin estrato córneo de 4 a 6 capas de células de espesor (40 μm a 50 μm) caracterizado por una

extrema uniformidad de limbo a limbo (Eghrari *et al.*, 2015). El epitelio juega un papel central en la visión al formar parte integral de la interface película lagrimal-córnea que es crítica para el poder refractivo del ojo (DelMonte y Kim, 2011). Se compone de tres capas celulares que difieren en morfología: la capa basal (columnar), la capa celular intermedia (alar/poliédrica) y la capa celular superficial (escamosa) (Figura 3) (Massoudi *et al.*, 2015).

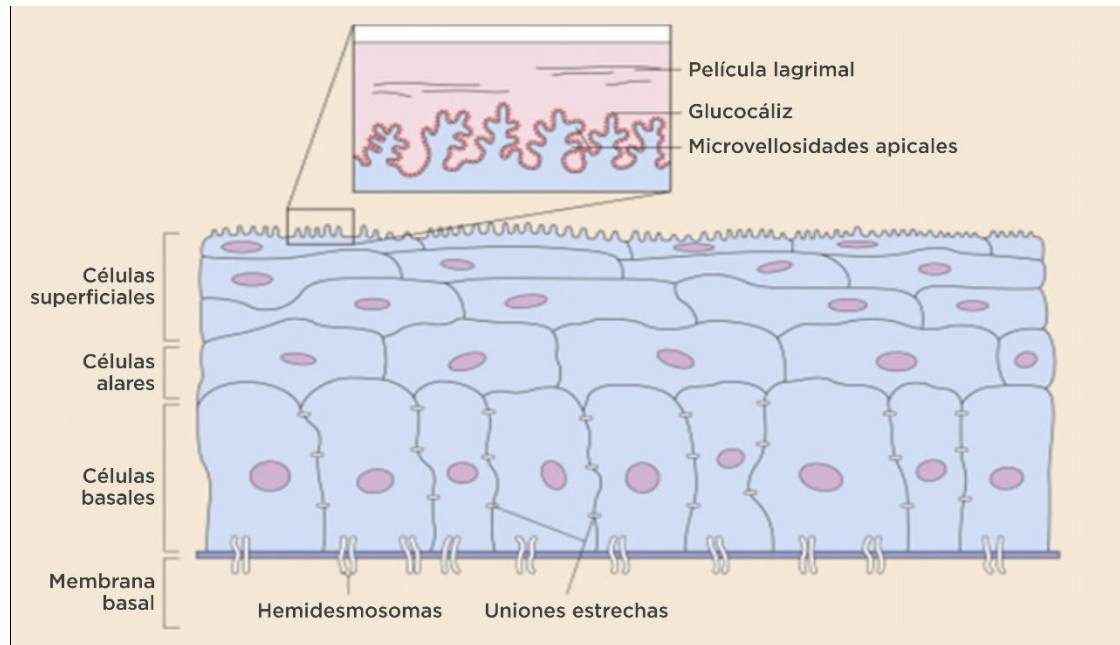


Figura 3. Vista en sección transversal del epitelio corneal. Se observan las tres capas que componen el epitelio anterior: la capa basal con células columnares, la capa intermedia de células alares y la capa superficial de células planas con microvellosidades y cubiertas de un glucocáliz. Tomada de DelMonte y Kim, 2011.

La capa más profunda del epitelio corneal es la capa basal, que comprende una sola capa de células columnares de aproximadamente 20 μm de alto. Además de las células madre y de las células amplificadoras transitorias, las células basales son las únicas células epiteliales corneales que experimentan mitosis. Estas células son la fuente de las células alares y de las células superficiales. Poseen uniones laterales tipo gap y zonula adherens y están unidas a la membrana basal subyacente mediante hemidesmosomas. Esta fuerte unión previene que el epitelio se separe de las capas corneales subyacentes (DelMonte y Kim, 2011).

Por encima de las células basales se encuentran las células alares o suprabasales que contribuyen con una capa de 2 a 3 células de espesor y también muestran complejos de

uniones estrechas entre las células y las membranas adyacentes se interdigitan (Eghrari *et al.*, 2015). Estas células son menos planas que las células superficiales, son más o menos cuboides y deben su nombre a su forma irregular con proyecciones cortas (alas) que se extienden desde la célula (Oyster, 1999).

Las células epiteliales más superficiales forman en promedio 2 a 3 capas de células planas poligonales. Estas células tienen microvellosidades y micropliegues apicales extensos, que a su vez están cubiertas por un glucocáliz cargado. Estas proyecciones apicales de membrana incrementan la superficie de contacto y adherencia entre la capa mucilaginosa de la película lagrimal y la membrana celular. En la periferia de las células, las uniones estrechas proveen un sello hermético y ayudan a prevenir la entrada de microorganismos y toxinas en las capas corneales más profundas (Eghrari *et al.*, 2015). Además, estas células se sobrelapan extensamente y las membranas celulares adyacentes se interdigitan, creando largos y sinuosos caminos extracelulares entre las células (DelMonte y Kim, 2011). Las células escamosas presentan vacuolas, características de estas células, y su número incrementa conforme se acerca el tiempo en que las células serán desescamadas del epitelio (Oyster, 1999).

Las múltiples capas celulares en el epitelio, las uniones estrechas y los procesos celulares interdigitantes que crean un largo espacio extracelular, son factores que ayudan a que el epitelio corneal sea una barrera al libre movimiento de agua de las lágrimas al estroma, lo que ayuda a mantener el estado de deshidratación de la córnea (Oyster, 1999).

Bajo condiciones normales, el epitelio corneal se reemplaza continuamente a medida que las células se desprenden. En promedio, las células epiteliales corneales tienen un tiempo de vida de 7 a 10 días y rutinariamente sufren diferenciación, apoptosis y descamación. Este proceso resulta en un recambio completo del epitelio corneal cada semana de tal modo que las células más profundas reemplazan a las células superficiales descamadas de manera ordenada y apicalmente dirigida (DelMonte y Kim, 2011).

La mayoría de las células madre necesarias para la regeneración del epitelio residen en el limbo esclerocorneal. A estas células se les conoce como células madre limbares. Las células madre limbares pueden replicarse a sí mismas, así como proporcionar células potencialmente proliferativas, denominadas células amplificadoras transitorias. Las células amplificadoras transitorias a su vez dan lugar a las células basales que se diferencian y

migran para repoblar la córnea. Las células basales madurarán para convertirse en las células alares y eventualmente en las capas de células planas escamosas más externas, que se desprenderán en la película lagrimal que cubre la superficie anterior según sea necesario. Las microvellosidades aparecen gradualmente en la superficie durante el proceso de maduración. Si el limbo se ve afectado por una enfermedad o lesión, las células madre limbares se pierden o se agotan, haciendo imposible la regeneración normal del epitelio corneal (Ruberti *et al.*, 2014; Eghrari *et al.*, 2015).

El epitelio corneal descansa sobre una membrana basal de aproximadamente 0.05 μm de espesor próxima a la membrana de Bowman (DelMonte y Kim, 2011). La membrana basal es un límite que separa el epitelio del estroma. En los seres humanos la ultraestructura de la membrana basal revela capas adyacentes denominadas lámina lúcida y la lámina densa. Mientras que la lámina lúcida está estructurada con lamininas, la lámina densa se compone en gran parte de colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) y entactina (Eghrari *et al.*, 2015). Las células epiteliales basales producen los componentes de la lámina basal que se produce durante la vida adulta, aunque la tasa de secreción es lenta excepto en algunas enfermedades tales como la diabetes (Beuerman y Pedroza, 1996).

Membrana de Bowman

La membrana de Bowman es una capa acelular posterior a la membrana basal epitelial, no es una membrana independiente sino la porción más anterior del estroma. Está compuesta de fibras cortas de colágeno tipo 1 embebidas en una matriz de proteoglicanos y dispuestas en una forma aparentemente aleatoria. Tiene aproximadamente 15 μm de espesor y disminuye con el tiempo (Eghrari *et al.*, 2015). Esta capa ayuda a la córnea a mantener su forma y actúa como una barrera contra la diseminación de infecciones. Cuando se lesiona, no se regenera y puede formar una cicatriz opaca (DelMonte y Kim, 2011).

Las fibras de colágeno en la membrana de Bowman están distribuidas de tal manera que su superficie posterior se fusiona con el estroma anterior dejando una superficie anterior lisa. Estas fibras son solamente de la mitad a dos tercios del espesor de las fibrillas de colágeno en el estroma (Eghrari *et al.*, 2015) y no siempre corren paralelas a la superficie corneal o entre ellas, en consecuencia, esta capa carece de la estructura laminar regular del estroma. Parece, de hecho, que se observan los extremos de las fibrillas de colágeno que se han

curvado hacia la superficie y se entrelazan en un arreglo que sugiere que algunas de las fibras de colágeno más anteriores en el estroma no recorren toda la córnea, sino que, terminan en la membrana de Bowman, y sus extremos entrelazados componen esta capa (Oyster, 1999).

Estroma

El estroma corneal provee la mayor parte de la red estructural de la córnea. Tiene aproximadamente 500 μm de espesor y representa aproximadamente 90% del eje corneal anterior-posterior. El estroma es un tejido conjuntivo altamente organizado, denso, avascular y relativamente acelular. Se compone de un complejo heterogeneo de fibras densas de colágeno, regularmente empaquetadas en capas paralelas o láminas. El estroma contiene 200 a 250 láminas, cada una dispuesta de manera ortogonal, en ángulo recto con respecto a las fibras de las láminas adyacentes (Figura 4). El estroma difiere de otras estructuras de colágeno en su transparencia, que es el resultado de la precisa organización de las fibrillas estromales y de la matriz extracelular (MEC) (DelMonte y Kim, 2011). Se piensa que la disposición ortogonal de las láminas, así como la separación uniforme de las fibras, dan lugar a una "interferencia destructiva" de los rayos luminosos entrantes, reduciendo así la refracción y promoviendo la transparencia corneal (West-Mays y Dwivedi, 2006). Por lo tanto, el estroma provee tanto soporte estructural como transparencia a la córnea al facilitar el paso de la luz a través de la red de fibras de colágeno de una manera que evita la dispersión de la luz (Oyster, 1999).

El estroma corneal tiene tres componentes primarios: colágenos, proteoglicanos (PGs) y células. También contiene glicoproteínas especializadas y por supuesto, iones que juegan un papel importante en la organización de las fibrillas de colágeno con el fin de mantener la transparencia (Meek y Knupp, 2015).

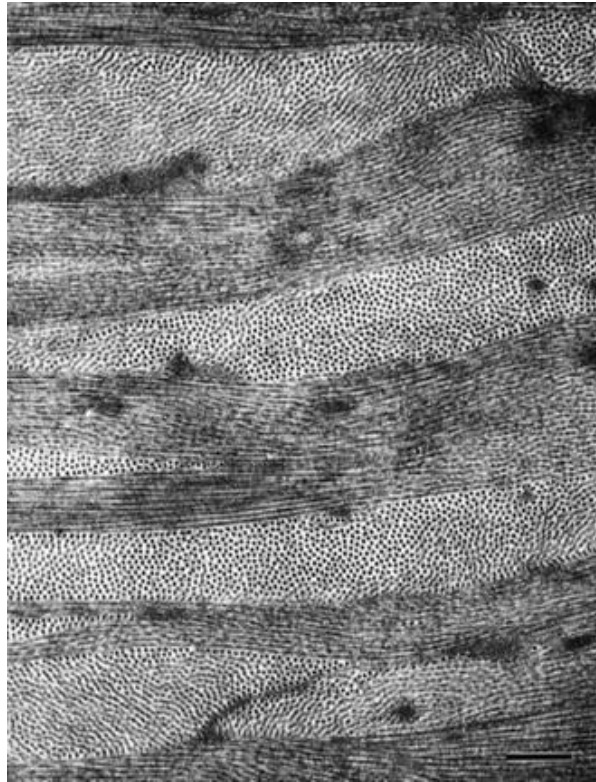


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión del estroma corneal que muestra las laminillas compuestas de fibrillas de colágeno densamente empaquetadas. Cada capa se encuentra aproximadamente en ángulos rectos respecto a la laminilla adyacente formando una red ortogonal. Tomado de Hassell y Birk, 2010

Colágenos

El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados. Es el componente principal de la matriz extracelular y hasta ahora se han descrito 28 tipos diferentes de colágeno en vertebrados. A pesar de sus diferencias, todos comparten una estructura de triple hélice compuesta por tres polipéptidos, conocidos como cadenas α , que consisten en repeticiones Gly-X-Y, donde X es cualquier aminoácido e Y es frecuentemente prolina o hidroxiprolina. Cada cadena es una hélice levógira, y las tres cadenas se enrollan entre sí en una super hélice dextrógira (Michelacci, 2003). La hidroxiprolina es importante en la estabilidad de la triple hélice y la hidroxilisina en la glicosilación (Hassell y Birk, 2010).

Los colágenos se pueden clasificar en: colágenos formadoras de fibrillas, son los más abundantes e incluyen los tipos I, II, III, V, VI y XI; colágenos asociados a fibrillas con hélices

triples interrumpidas (FACIT), se asocian con la superficie de las fibrillas de colágeno y modifican sus propiedades interactivas y colágenos no fibrilares, tales como los tipos XIII, XVII y XXV (Hassell y Birk, 2010).

Los principales colágenos formadores de fibrillas de la MEC del estroma corneal son los tipos I y V (Xuan *et al.*, 2016). Las fibrillas de colágeno del estroma corneal son fibrillas heterotípicas: ambos tipos de colágeno están presentes en cada fibrilla, pero a diferencia de otros tejidos, la relación colágeno V y colágeno I es notablemente más alta en el estroma corneal (representa el 15-20% de los colágenos fibrilares totales) (Meek y Knupp, 2015). El colágeno tipo V desempeña un papel central en el inicio del ensamblado de las fibrillas y en la regulación del diámetro de las mismas (Hassell y Birk, 2010; Massoudi *et al.*, 2015).

El colágeno tipo III se expresa normalmente en el estroma corneal en proporciones bajas pero aumenta durante la cicatrización de heridas, inflamación y otras condiciones patológicas (Xuan *et al.*, 2016) por lo que se considera como uno de los principales marcadores de la remodelación de la matriz estromal observada después de una lesión corneal. La modificación de la cantidad de colágeno tipo III y por lo tanto la alteración de la relación de colágeno de tipo I / tipo III puede ser responsable de la formación de una opacidad en la córnea (Massoudi *et al.*, 2015).

El colágeno VI se localiza en filamentos que forman una extensa red alrededor de las fibrillas del estroma, así como adyacente a fibroblastos corneales. Forma estructuras microfibrilares por agregación lateral, dada su estructura de red, se piensa que influye en la integridad de la matriz mediante la interconexión de la MEC en una malla estable dentro del estroma corneal (Chen *et al.*, 2015).

Los colágenos FACIT presentes en la córnea incluyen los tipos XII y XIV. En el estroma corneal maduro, se cree que el colágeno XII estabiliza las asociaciones entre las fibrillas, y mantiene el empaquetamiento de las fibrillas a lo largo de las laminillas del estroma (Chen *et al.*, 2015). Además, los colágenos XII y XIV afectan a la fibrilogénesis, maduración y mantenimiento del estroma corneal. Los colágenos FACIT interactúan con la superficie de las fibrillas de colágeno y con otros componentes de la MEC, así como con moléculas asociadas con proteínas unidas a la membrana celular. Por lo tanto, los colágenos FACIT sirven para modular las propiedades superficiales de las fibrillas, afectan el empaquetamiento de las mismas y mantienen el nicho de la MEC a través de interacciones

célula-matriz. De tal manera que, tienen el potencial de afectar la transparencia y la refracción corneal al regular el crecimiento lineal y lateral de las fibrillas durante la organización de la MEC (Chen *et al.*, 2015).

Dentro de los colágenos no fibrilares, el colágeno XIII, un tipo de colágeno que está unido a la membrana celular a través de un único dominio transmembranal, se expresa ampliamente en el ojo humano y se ha encontrado en los dos tercios posteriores del estroma corneal (Michelacci, 2003).

El ensamblado de las fibrillas de colágeno comienza cuando el procolágeno se transforma en colágeno, que se ensambla en protofibrillas. Una vez que las protofibrillas se depositan en la matriz extracelular, se produce el ensamblado en estructuras de orden superior en una serie de microdominios compartimentalizados. El establecimiento de una jerarquía de microdominios dentro del espacio extracelular proporciona un mecanismo para que el queratocito ejerza control sobre los pasos extracelulares en el ensamblado de la matriz extracelular, ya sea mediante el secuestro de las enzimas de procesamiento del procolágeno en los sitios del ensamblaje inicial de las fibrillas o mediante la adición de moléculas asociadas con fibrillas durante o después del ensamblaje de la protofibrilla (Chen *et al.*, 2015).

Cuando los colágenos I y V se ensamblan conjuntamente, la triple hélice de la colágeno V se internaliza dentro de la fibrilla, mientras que el dominio N-terminal se proyecta hacia la superficie fibrilar. Así, las propiedades intrínsecas a estas interacciones colágeno-colágeno regulan la nucleación y el ensamblaje de la protofibrilla. Existen alrededor de 300-400 moléculas de triple hélice dentro de la sección transversal de una fibrilla, con una periodicidad axial reducida, de lo habitual de 67 nm observada en el tendón y la esclerótica, a cerca de 65 nm (Meek y Knupp, 2015). De estas moléculas, aproximadamente 30-40 son colágeno tipo V, el resto es tipo I. Debido a que el contenido de colágeno V en la córnea es mayor que en la mayoría de los otros tejidos ricos en colágeno I, esta característica conduce a un mayor número de eventos de nucleación, produciendo así un gran número de protofibrillas de pequeño diámetro. Esta característica de ensamblaje de fibrillas es esencial para la córnea (Chen *et al.*, 2015). Además, la incorporación de colágeno tipo V en las fibrillas juega un papel importante en la limitación del número de moléculas que pueden autoensamblarse dentro de la fibrilla (Meek y Knupp, 2015).

La segunda etapa de la fibrilogénesis corneal implica un crecimiento lineal de las fibrillas, necesario para establecer las propiedades de tensión requeridas para mantener la estructura de la superficie anterior del ojo y resistir las fuerzas de compresión debidas a la hidratación en la matriz interfibrilar altamente cargada. Además, existe una inhibición del crecimiento lateral de las fibrillas, lo cual es esencial porque las fibrillas de gran diámetro son incompatibles con la transparencia (Chen *et al.*, 2015).

El estroma corneal es único en tener una distribución homogénea de fibrillas de colágeno de diámetro pequeño. Cada fibrilla tiene 20-35 nm de diámetro y están alineadas paralelamente entre sí con espaciamiento regular de 30 nm entre ellas. Se cree que este espaciamiento regular está regulado por los proteoglicanos, que se ha observado, forman estructuras como anillos alrededor de las fibrillas de colágeno en la córnea normal (Shah *et al.*, 2008). La transparencia corneal es una propiedad física única que resulta del espaciado uniforme de las fibras de colágeno de diámetro pequeño (Oyster, 1999).

Las fibrillas de colágeno en la córnea deben resistir las fuerzas de tracción debidas a la presión intraocular y proteger los tejidos oculares internos del trauma externo y al mismo tiempo permanecen estrechas para permitir la transparencia del tejido (Meek y Knupp, 2015).

Las fibrillas forman estructuras más grandes características de los tejidos específicos, en este caso, las laminillas del estroma corneal (Chen *et al.*, 2015). Estas estructuras son de grosor variable, en los humanos normalmente tienen hasta 0.2 mm de ancho y 2 μ m de espesor. En el centro de la córnea hay aproximadamente 200 laminillas y su organización según la profundidad dentro del estroma. La densidad de empaquetamiento es más alta en las láminas anteriores que en las posteriores. Estas láminas anteriores son cortas, estrechas y están altamente entrelazadas. La mayoría parecen insertarse en la membrana de Bowman con ángulos de inserción de aproximadamente 19 grados, lo que proporciona soporte estructural para mantener la forma de la superficie corneal anterior. Las laminillas del estroma medio también están muy entrelazadas, mientras que las láminas posteriores de la córnea central son largas, gruesas y están menos entrelazadas y más hidratadas. Estas laminillas se extienden de limbo a limbo y no tienen conexiones interlamelares significativas. La disposición de las láminas dentro de la córnea ayuda a mantener la forma general del tejido. La variación en la organización del estroma explica las diferencias en la

respuesta al edema corneal, el estroma posterior puede hincharse fácilmente, mientras que el anterior, más entrelazado, no puede (Meek y Knupp, 2015; Eghrari *et al.*, 2015).

El índice de refracción de la córnea disminuye conforme la luz pasa a través del eje anterior-posterior, debido a que la córnea posterior está más hidratada. Una desorganización en este patrón de las laminillas, ya sea por hidratación o por depósitos anormales, altera la transparencia y resulta en pérdida de la visión (Eghrari *et al.*, 2015). Por lo tanto, el espesor del estroma y la disposición de las fibras de colágeno son óptimas para que las ondas de luz visible pasen a través de la córnea con una dispersión mínima de la luz. Este patrón fibrilar específico en la córnea aparece durante el desarrollo embrionario (Michelacci, 2003).

Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son macromoléculas compuestas de un núcleo proteico con cadenas laterales de glucosaminoglucanos (GAGs) unidas covalentemente. Estos compuestos altamente cargados constituyen los segundos materiales biológicos más abundantes en el estroma, después del colágeno (Kao y Liu, 2003). Junto con los colágenos FACIT, los proteoglicanos tienen un papel importante en la modificación de la estructura y función de las fibrillas de colágeno al interactuar fuertemente con los otros componentes de la MEC (Hassell y Birk, 2010; Michelacci, 2003).

Las cadenas laterales de GAGs son repeticiones de disacáridos con ésteres de sulfato. Existen tres tipos de cadenas laterales de GAG: dermatan sulfato (DS), queratán sulfato (KS) y heparán sulfato (HS). Las cadenas de DS y HS están unidas a la proteína central en residuos de serina que son seguidos por un residuo de glicina. Las cadenas de KS se unen principalmente a las asparaginas que están dentro de un residuo de serina o treonina (Hassell y Birk, 2010).

El estroma adulto normal contiene cuatro proteoglicanos: lumican, queratocan, mimecan y decorina (Hassell & Birk, 2010). Los tres primeros contienen GAGs de KS mientras que el último contiene DS. Los proteoglicanos de queratán sulfato (lumican, queratocan y mimecan) son la clase principal de PGs en el estroma corneal normal (Fini, 1999).

La cantidad de KS en la córnea es 10 veces mayor que en el cartílago y 2 a 4 veces mayor el encontrado en otros tejidos (Funderburgh, 2000). La gran abundancia de KS parece estar

relacionada con el mantenimiento del nivel de hidratación del tejido, ya que el contenido de agua en la matriz de proteoglicanos necesita ser mantenida dentro de límites muy estrechos para mantener el espaciado de las fibrillas de colágeno regular y constante. Para ello, la presencia de grupos sulfato en las cadenas de GAGs es esencial, ya que estos grupos unen agua (Oyster, 1999). Los proteoglicanos de queratán sulfato y de dermatán sulfato de la córnea tienen propiedades de unión al agua distintas. A los niveles de hidratación característicos del estroma corneal normal, las cadenas de dermatán sulfato están completamente hidratadas, mientras que las cadenas de queratán sulfato están parcialmente hidratadas, lo que sugiere que el KS actúa como un amortiguador dinámico para la hidratación corneal (Funderburgh, 2000; Hassell y Birk, 2010).

Los proteoglicanos corneales tienen una proteína central de estructura similar que pertenece a la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) (Kao y Liu, 2003). Estas proteínas son también similares en tamaño (35-40 kD, mucho más pequeñas que la mayoría de otros proteoglicanos). La decorina tiene una sola cadena de 55-60 kD de DS, mientras que el lumican, queratocan y mimecan tienen 2 a 3 cadenas de KS de 10-15 kD cada una. El tamaño total de estos proteoglicanos es entonces, lo suficientemente pequeño para caber en los espacios entre las fibrillas de colágeno y regular su espaciado (Figura 5) (Hassell y Birk, 2010).

Los SLRPs contienen, como su característica estructural principal, un dominio central que representa entre el 60 y el 80% de los aminoácidos totales compuesto por diez repeticiones de leucina en tándem que son homólogas en estructura, similares en longitud y están igualmente espaciadas dentro del dominio central de la proteína. La mayoría de los residuos de leucina están en posiciones conservadas con una secuencia consenso general de LXXLXNXL (Kao *et al.*, 2003). La cadena polipeptídica se enrolla en una espiral estrecha de tal modo que todas las regiones ricas en leucina quedan alineadas en una superficie de la espiral y las regiones no ricas en leucina en la superficie opuesta (Hassell y Birk, 2010). Las regiones alineadas ricas en leucina interactúan con las moléculas de colágeno para regular la formación de las fibrillas, mientras que la superficie no rica en leucina contiene la mayoría de las asparaginas que son sitios de unión para las cadenas de KS (Chen *et al.*, 2015).

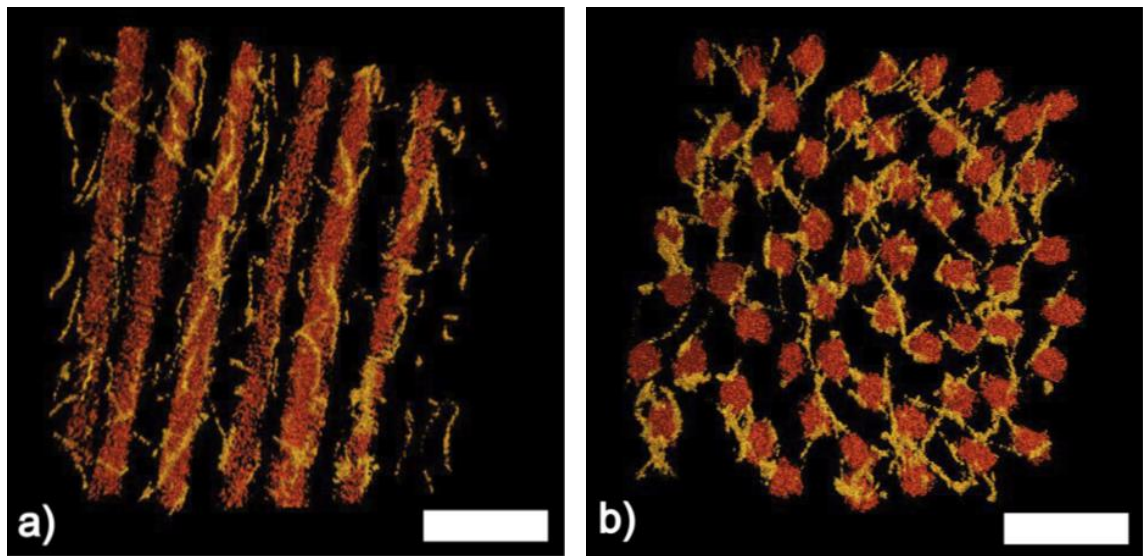


Figura 5. Reconstrucción tridimensional del estroma corneal (a) Sección longitudinal. (b) sección transversal. Las fibrillas de colágeno se representan en naranja y los proteoglicanos en amarillo. Barras de 100 nm. Tomado de (Meek y Knupp, 2015)

Las variaciones en las propiedades de los proteoglicanos individuales se derivan de la sustitución de aminoácidos en los dominios N y C-terminales menos conservados, de los residuos superficiales, de los cambios en el número y la longitud de las repeticiones ricas en leucina y de las variaciones en la glicosilación (Kao y Liu, 2003).

Los SLRPs son reguladores críticos del ensamblaje de la matriz extracelular a través de su carácter bi-funcional: el motivo proteico en forma de herradura se une a las fibrillas de colágeno por su parte cóncava en sitios estratégicos para regular sus diámetros y las cadenas hidrofílicas de GAG altamente cargadas se extienden hacia afuera y regulan el espaciado interfibrilar (Kao y Lui, 2003). También se ha propuesto que los GAGs unen y transfieren fuerza entre las fibrillas adyacentes, mejorando así la integridad mecánica del tejido (Chen *et al.*, 2015).

Como se mencionó previamente, el lumican y el queratocan son los principales proteoglicanos de queratán sulfato pertenecientes a la familia de los SLRPs en el estroma. El queratocan es un proteoglicano específico del estroma corneal mientras que el lumican también se encuentra en otros tejidos como la piel (Eghrari *et al.*, 2015).

La expresión de queratocan y lumican en el estroma corneal muestra diferencias tanto temporales como espaciales. Mientras que la expresión de ambos es homogénea a través del

estroma en el nacimiento, la expresión de lumican se restringe al estroma posterior después de la maduración (Chen et al., 2015).

Diversos estudios han demostrado que la síntesis defectuosa de estos proteoglicanos causa ceguera en los humanos por la disrupción de la organización de las fibras de colágeno. (Massoudi *et al.*, 2015).

El papel crucial del lumican y el queratocan en la regulación del crecimiento y el ensamblaje de las fibrillas de colágeno se ha estudiado mediante la inactivación de genes en ratones. Los ratones deficientes en queratocan muestran un adelgazamiento del estroma corneal y desarrollan fibrillas de colágeno de diámetro significativamente mayor, lo que sugiere que el queratocan limita el crecimiento lateral de las fibrillas. Además, estos ratones presentan un espaciamiento irregular de las fibrillas de colágeno sin afectación de la transparencia corneal (Chakravarti, 2006). Además, se ha demostrado que en los humanos, las mutaciones en el gen que codifica para queratocan (KERA), provocan córnea plana, una condición que consiste en el aplanamiento de la curvatura convexa de la córnea, dando lugar a una disminución de la refracción (Michelacci, 2003).

En contraste, los ratones homocigotos para una mutación nula en el gen del lumican presentan fragilidad de la piel y opacidad corneal bilateral, con presencia de una matriz desorganizada colágeno. Se ha demostrado en pruebas *in vitro*, que la proteína central del lumican, pero no sus cadenas GAG, inhiben la formación de fibrillas de colágeno y reducen su diámetro. El lumican juega un papel importante en la regulación del ensamblado de la matriz de colágeno del estroma al actuar en diferentes etapas del crecimiento fibrilar, interaccionar con las diferentes regiones de la molécula de colágeno, estabiliza las fibrillas de colágeno una vez formadas y mantiene el contenido óptimo de KS necesario para la transparencia (Massoudi *et al.*, 2015).

Además del colágeno y los proteoglicanos, la avascularidad del estroma corneal también es necesaria para facilitar la transparencia. La producción de factores anti-angiogénicos ayuda a mantener un balance con los factores proangiogénicos. Estos incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es anulado efectivamente por la secreción corneal del receptor soluble de VEGF (sVEGFR-1 o sflt-1) que captura al VEGF y bloquea su actividad (Eghrari *et al.*, 2015).

Queratocitos

Los queratocitos son el principal tipo celular del estroma. Son una población de células mesenquimales quiescentes encargadas de mantener la integridad del estroma mediante la producción de colágeno, glucosaminoglucanos y metaloproteasas de matriz extracelular (MPP), todos ellos cruciales en el mantenimiento de la homeostasis estromal (Eghrari *et al.*, 2015). La mayoría de los queratocitos residen en el estroma anterior (DelMonte y Kim, 2011) y contribuyen con únicamente 2 a 3% al volumen del estroma (Oyster, 1999).

Los queratocitos tienen un cuerpo celular compacto con numerosos lamelipodios, lo que les da una morfología tipo dendrítica (Figura 6). El cuerpo celular compacto minimiza el área superficial del queratocito expuesta a la luz, reduciendo así la dispersión. Estas células presentan una rotación lenta y están dispersamente dispuestas entre las laminillas de colágeno en el estroma, aunque forman una red celular interconectada entre sí a través de procesos dendríticos (Hassell y Birk, 2010), lo que puede ser una manera de coordinar sus actividades mientras mantienen la organización de las fibras de colágeno en el tejido (Oyster, 1999).

Entre el nacimiento y la apertura del párpado, el número de queratocitos mitóticamente activos disminuye dramáticamente de 20% del total a casi cero. En el momento de la apertura del párpado, los queratocitos se han retirado del ciclo celular, permaneciendo en Go en lugar de sufrir completa diferenciación terminal (West-Mays y Dwivedi, 2006).

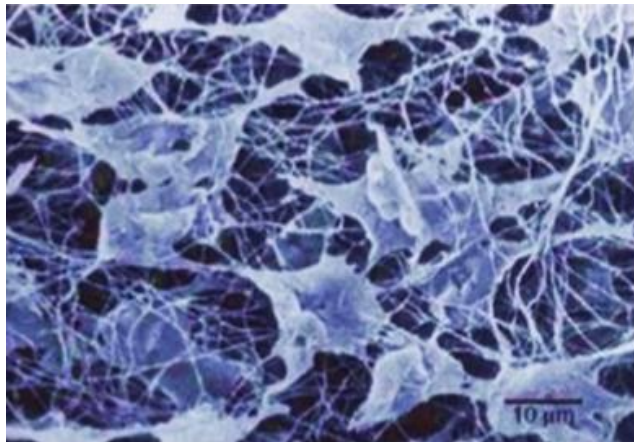


Figura 6. Queratocitos en el estroma corneal. Se observan varias capas de queratocitos después de que se removió la mayor parte de las fibras de colágeno. Los procesos dendríticos conectan las células vecinas.

Los queratocitos también están involucrados en la transparencia corneal. Estas células contienen moléculas citoplasmáticas denominadas cristalininas corneales. Similar al cristalino, las cristalininas corneales son proteínas hidrosolubles que disminuyen la dispersión de la luz y absorben la luz UV cuya función es contribuir a la transparencia de la córnea. Estas incluyen a la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), transquetolasa (TKT), y alfa-enolasa. Las primeras dos comprenden el 50% y 10% respectivamente de las proteínas hidrosolubles en la córnea (Eghrari *et al.*, 2015).

TKT y ALDH1 se acumulan en el citoplasma celular y cambian el índice de refracción del citoplasma celular para que coincida mejor con la matriz extracelular y así eliminar la dispersión. Se ha demostrado que en los queratocitos normales en una córnea transparente, la luz se dispersa sólo desde el núcleo de la célula, pero no desde el cuerpo celular (Shah *et al.*, 2008).

Tras una lesión corneal, los queratocitos son estimulados para sufrir muerte celular o para perder su quiescencia y transitar a fenotipos reparadores, dependiendo de las señales ambientales específicas. Estos fenotipos pueden promover la reparación o pueden inducir la formación de cicatrices fibróticas que son perjudiciales para la visión (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Dado que los queratocitos proceden de una población de células de la cresta neural craneal, se ha postulado que algunas de sus propiedades de reparación exhibidas después de una herida, pueden atribuirse a sus características similares a las células madre, que fueron retenidas de su célula de origen (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Respuesta de los queratocitos a la lesión de la córnea

Muerte celular de los queratocitos

Uno de los primeros cambios observables en el estroma corneal después de una herida incisional a través del epitelio es la muerte de los queratocitos que se encuentran adyacentes al sitio de la herida. En el caso de las heridas epiteliales en las que no hay disrupción de la membrana basal subyacente, los queratocitos que se encuentran inmediatamente debajo de ésta sufren apoptosis. Poco después de la muerte, estas células son reemplazadas por nuevos queratocitos a través de la mitosis de las células adyacentes, y en consecuencia, no se

produce ninguna otra respuesta de los queratocitos. Esta muerte inicial de los queratocitos es una respuesta benigna, que se cree ha evolucionado para proteger la córnea de una inflamación adicional y la subsiguiente pérdida de la transparencia (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Se sugiere que citocinas como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), secretadas por el epitelio anterior pueden modular la apoptosis de los queratocitos. Específicamente, se cree que IL-1 induce la muerte de queratocitos actuando como un estimulador para la producción autocrina del ligando FAS, un mediador apoptótico (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Transición de los queratocitos a un fenotipo "activado"

En lesiones en las que la membrana basal del epitelio corneal se ve afectada, la muerte inicial de los queratocitos en la córnea es seguida por la transición de una subpoblación de los queratocitos viables restantes a un fenotipo de reparación o "fenotipo activado". El proceso de reparación en el estroma corneal comienza con esta activación de los queratocitos adyacentes a la zona acelular en el borde de la herida. La región de activación ocupa un estrecho borde de unos cientos de micras de ancho a cada lado del área dañada.

Aproximadamente 6 h después de la lesión, los queratocitos activados pierden su quiescencia y entran en el ciclo celular. Los primeros cambios detectables son un aumento en el tamaño de los queratocitos y un aumento en el tamaño y número de nucleolos. El número de vesículas y fagosomas también aumenta. Dentro de las 24 h, los queratocitos activados migran a la zona acelular y al segundo día alcanzan el borde de la herida. Las células alcanzan el borde de la herida y comienzan a proliferar aproximadamente 72 h después de la lesión. En el momento en que llegan al borde de la herida, aparecen como fibroblastos típicos. El contenido de organelos aumenta y comienzan a exhibir muchas características morfológicas de los fibroblastos activos, incluyendo una morfología fusiforme, nucleolos múltiples y falta de gránulos citoplasmáticos (West-Mays y Dwivedi, 2006). También se ha observado que estas células incorporan precursores macromoleculares, lo que sugiere además que son activamente sintéticos. Parte de esta actividad sintética implica la replicación del ADN. En modelos de heridas corneales en roedores, la tasa de mitosis alcanza el pico más alto alrededor del sexto día, momento en el

que se ha formado una red fibroblástica de células paralela a la superficie del corte. Gran parte de la actividad sintética del fibroblasto de reparación en este punto está implicada en la producción de la MEC de reparación, que tiene una composición diferente al del estroma normal no dañado (Fini, 1999).

Un cambio importante en la MEC es la aparición de fibronectina. La proporción de los tipos de colágeno también es diferente de los tipos encontrados en la MEC del estromal normal. La síntesis de proteoglicanos de KS disminuye, mientras que se induce la síntesis de proteoglicanos de DS. La composición alterada de la matriz extracelular sintetizada por los fibroblastos reparadores, así como la forma desordenada de su deposición, contribuyen probablemente a la opacidad del tejido de reparación (Fini, 1999).

Además de depositar la MEC de reparación, los fibroblastos también activan la síntesis de enzimas que pueden degradarla. Las principales MMPs expresadas por los fibroblastos reparadores son colagenasa, estromelina y gelatinasa B. Estas moléculas no son sintetizadas por los queratocitos del estroma normal. La colagenasa es reactiva específicamente contra la triple hélice de colágeno tipo I, y la estromelina puede degradar una amplia gama de componentes de la matriz, incluyendo proteoglicanos. Las gelatinasas también tienen una reactividad amplia, incluyendo moléculas de colágeno desnaturalizadas, componentes de la membrana basal y elastina. Los cambios en la expresión de MMPs son responsables de remodelar el tejido de reparación (Fini, 1999). La reparación también se asocia con pérdida en la expresión de las cristalinas corneales ALDH-1 y TK (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Los factores de crecimiento y citocinas involucrados en la activación de queratocitos son: FGF-2, que estimula altos niveles de proliferación y síntesis de proteoglicanos, pero inhibe la síntesis de colágeno; produciendo de este modo una MEC escasa. IL-1 α , que induce la expresión de colagenasa en fibroblastos activados. La IL-1 α es producida por el epitelio corneal, aunque con el tiempo, las células del estroma obtienen competencia para la síntesis autocrina de IL-1 α . De este modo, la secreción autocrina permite que los queratocitos activados continúen con la remodelación del tejido en reparación en ausencia de la IL-1 α secretada por el epitelio (West-Mays y Dwivedi, 2006). La interleucina 1 (IL-1) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) son quimioatrayentes y estimulan la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, en algunos casos, IL-1 y TGF- β tienden a tener actividades

opuestas. IL-1 se asocia generalmente con funciones inflamatorias y degradativas, mientras que TGF- β estimula las actividades que contribuyen a la deposición de MEC (Fini, 1999).

TGF- β no se encuentra en el epitelio corneal normal, pero su expresión se induce durante la reparación. También puede ser producido por la población transitoria de macrófagos presentes en la córnea y por otras células inflamatorias, tales como neutrófilos y linfocitos que invaden el estroma horas después de la herida (Hassell y Birk, 2010). IL-1 se expresa en el epitelio corneal normal, pero probablemente se mantiene secuestrada en la célula. La actividad de ambas citocinas, se controla en muchos niveles y cualquier cambio que afecte el balance de la actividad entre IL-1 α y TGF- β 2, tendría importantes efectos sobre el fenotipo de fibroblastos y la acumulación de tejido de reparación en las heridas corneales (Fini, 1999).

Transición al fenotipo de miofibroblastos

La transición a miofibroblasto es otro fenotipo de queratocitos observado en el estroma corneal después de una lesión. Estas células son una subpoblación de fibroblastos activados que se caracterizan por la aparición intracelular de actina alfa de músculo liso (α SMA), proteína implicada en la contracción de la herida, por la producción de altos niveles de colágeno, hialuronano y biglycan pero niveles bajos de proteoglicanos de KS y por la producción de una MEC desorganizada y opaca (Hassell y Birk, 2010).

Se cree que los miofibroblastos corneales son responsables de la contracción de la herida, así como de la deposición de tejido fibrótico. El TGF- β liberado por las células epiteliales, ha sido identificado como el inductor de la transformación de queratocitos corneales en miofibroblastos al inducir la síntesis de α SMA. A pesar de esta transformación, se ha observado que los fibroblastos corneales activados y los miofibroblastos no son fenotipos diferenciados terminalmente y tienen la capacidad de transitar entre uno y otro fenotipo (West-Mays y Dwivedi, 2006).

Cualquier cambio en el contenido citoplásmico cuando los queratocitos se transforman en miofibroblastos altera el índice de refracción, lo que contribuye al aumento de la dispersión de la luz. Se ha demostrado que el índice de refracción del citoplasma de los queratocitos coincide con el del estroma, mientras que, tras su activación, el índice de refracción disminuye. Este cambio es suficiente para aumentar significativamente la dispersión de la luz por estas células (Meek y Knupp, 2015).

Aunque una lesión del estroma puede curarse sin cicatrices, es frecuente que la remodelación de una cicatriz ocurra durante un período largo (1 a 3 años), con una alta probabilidad de que cualquier cicatrización sea permanente. No está claro por qué sólo algunas veces el estroma sana sin producir una cicatriz. Tal vez depende de la respuesta de la población residente de las células madre de queratocitos que cuando son activadas adecuadamente minimizan la cicatrización (Ruberti *et al.*, 2014).

Membrana de Descemet

La membrana de Descemet es una membrana basal gruesa secretada por endotelio corneal. Tiene aproximadamente 3 μm de espesor en niños pero se produce en forma continua y sufre un engrosamiento gradual con los años hasta alcanzar los 10 a 15 μm en adultos. (Eghrari *et al.*, 2015). Esta membrana forma una barrera dura y resistente a la perforación de la córnea. A diferencia de la membrana de Bowman, la membrana de Descemet se regenera con rapidez después de su lesión (Ross y Pawlina, 2007)

La membrana de Descemet aparece como una banda clara, delgada entre el endotelio y el estroma. Se considera la membrana basal del endotelio, ya que es secretada por éste, pero no hay hemidesmosomas u otras uniones de anclaje entre la membrana de Descemet y el endotelio por lo que las células presumiblemente permanecen en la superficie posterior por la fuerza de la presión intraocular (Oyster, 1999).

La membrana de Descemet se compone de dos capas: una capa anterior bandeada que se secreta antes del nacimiento y permanece relativamente constante y una capa posterior no bandeada que se engruesa con los años (Figura 7) (Eghrari *et al.*, 2015).

Estructuralmente, la membrana de Descemet contiene principalmente fibras de colágeno tipo IV y VIII, aunque también se han reportado los tipos V, IX y XII con una distribución variada entre la porción anterior bandeada y la porción posterior no bandeada. La membrana de Descemet también contiene laminina y fibronectina así como queratán sulfato, heparán sulfato y dermatán sulfato y al igual que el estroma, requiere una apropiada hidratación para mantener la transparencia corneal (Eghrari *et al.*, 2015).

En contraste con otras membranas basales en el cuerpo en las que el colágeno tipo IV es el más común, en la membrana de Descemet el colágeno tipo VIII es relativamente específico

a esta capa y forma estructuras como escalera, visibles bajo microscopía electrónica. El colágeno tipo VIII es dominante en la porción bandeada donde forma un enrejado regular elástico con bandas periódicas a intervalos de 110 nm, en cortes tangenciales presenta un patrón hexagonal muy regular (Ruberti *et al.*, 2011).

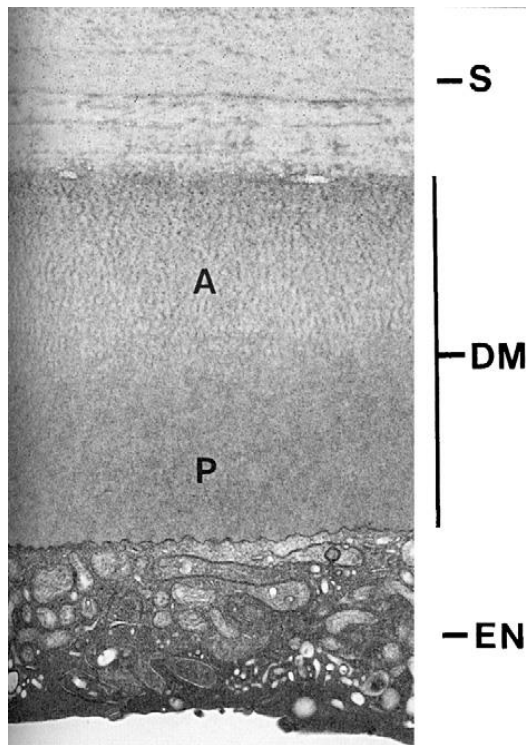


Figura 7. Micrografía que ilustra la membrana Descemet (DM) ubicada entre la cara posterior del estroma corneal (S) y el endotelio subyacente (EN). La capa anterior bandeada (A) es secretada por las células endoteliales durante el desarrollo embrionario y está más organizada que la capa posterior amorfa no bandeada (P), que se secreta después del nacimiento. Tomada de DelMonte y Kim, 2011.

Endotelio

El endotelio corneal es una monocapa de células planas poligonales que recubren la superficie posterior de la córnea de aproximadamente 4-6 μm de espesor. Tiene aproximadamente 400,000 células dispuestas en un mosaico hexagonal (Figura 8). Estas células tienen 20 μm de diámetro y están unidas en sus bordes por complejos de unión estrechos incompletos (Ruberti *et al.*, 2011). La función esencial del endotelio es regular la

hidratación corneal y mantener el estado de relativa deshidratación del estroma (78% de contenido de agua), necesario para la transparencia corneal. El endotelio también asegura la liberación de residuos en la córnea y la absorción de nutrientes (ya que éstos no son suministrados por los vasos sanguíneos como en otros tejidos); intercambios que se producen con el humor acuoso y que son necesarios para el metabolismo corneal (Massoudi *et al.*, 2015).

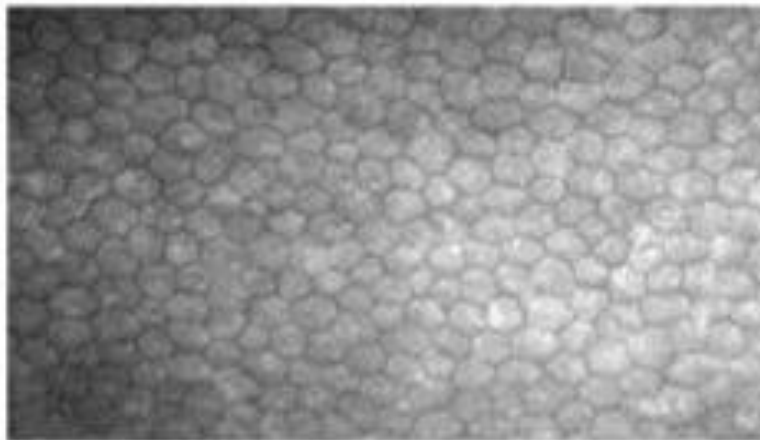


Figura 8. Fotomicrografía especular del endotelio normal. Se observan los bordes celulares bien definidos, el arreglo hexagonal regular y el tamaño uniforme de las células. Tomado de Navaratnam *et al.*, 2015.

Las células endoteliales tienen una zónula ocludens incompleta y una unión estrecha permeable entre las células adyacentes, lo que permite a los nutrientes y otras moléculas entrar en el estroma. Sus membranas laterales contienen una alta densidad de ATPasas Na^+/K^+ (Bourne, 2003).

El mantenimiento de la deshidratación estromal depende de las uniones estrechas entre las células endoteliales y de un proceso de bombeo en el que el fluido sale del estroma corneal por el gradiente osmótico, del estroma relativamente hipotónico hacia el humor acuoso relativamente hipertónico. Este movimiento pasivo de fluido no requiere energía, pero es alimentado por el proceso activo de transporte de iones para generar el gradiente osmótico. Los dos sistemas de transporte de iones más importantes son la ATPasa Na^+/K^+ y la anhidrasa carbónica. La actividad en estas dos vías produce un flujo neto de iones del estroma al humor acuoso. La barrera endotelial es única, ya que es permeable en cierto grado, permitiendo el flujo de iones necesario para establecer el gradiente osmótico

(DelMonte y Kim, 2011). Un fallo endotelial, por lo tanto, está marcado por edema corneal y debido al paso de fluido acuoso hacia la córnea a una tasa más alta que la cantidad que puede ser bombeada hacia el exterior durante un periodo de tiempo dado (Eghrari *et al.*, 2015).

La mayoría de los nutrientes de la córnea son suministrados por el endotelio corneal. Los transportadores de glucosa en las células permiten selectivamente que los nutrientes del humor acuoso ingresen al estroma para alimentar a los queratocitos y a las células epiteliales (Ruberti *et al.*, 2014).

Las células endoteliales son metabólicamente muy activas, con un gran número de mitocondrias, consistente con su necesidad de mover agua y nutrientes eficientemente. La densidad de las mitocondrias debería causar opacidad; sin embargo, las células endoteliales son muy delgadas, de manera que la longitud de la trayectoria óptica es corta, por lo que se dispersa poca luz a medida que pasa a través del endotelio (Ruberti *et al.*, 2014).

Otra característica de las células endoteliales es que no tienen actividad mitótica *in vivo*, de manera que el número de células disminuye naturalmente con la edad, pero el endotelio mantiene su continuidad mediante la migración y expansión de las células restantes (Oyster, 1999) por lo que el endotelio se vuelve menos regular con el tiempo. Conforme este proceso ocurre, las células restantes crecen en tamaño y pierden su forma hexagonal. La densidad celular promedio al momento del nacimiento es de aproximadamente 3,500-4,000 células/mm², número disminuye gradualmente 0.6% por año, así, la densidad celular a los 80 años es de 2,300 células/mm² (DelMonte y Kim, 2011).

Otros factores como enfermedades, cirugía ocular, exposición a los rayos UV, uso de lentes de contacto, traumas, inflamación y otros procesos patológicos pueden acelerar el declive del endotelio corneal. La densidad mínima de células endoteliales necesaria para mantener la función es de alrededor de 500 células/mm². Por debajo de esa cantidad, el endotelio no tiene suficiente potencia de bombeo para mantener la deshidratación relativa de la córnea, lo que conduce a que se vuelva opaca (Ruberti *et al.*, 2014).

Las células endoteliales están arrestadas en la fase G₁ del ciclo celular. La razón de la ausencia de progresión en el ciclo celular es aún desconocida, pero puede implicar la inhibición por contacto celular. La capacidad limitada de las células endoteliales corneales para proliferar sólo se ha observado *in vitro*. El endotelio periférico parece tener un potencial mayor (aunque limitado) para dividirse *in vitro* en comparación con el endotelio

corneal central. Además, esta limitada capacidad para proliferar *in vitro* se restringe generalmente al endotelio más joven (<30 años) (Bourne, 2003).

Inervación

La córnea, al ser la parte del ojo más expuesta al trauma, tiene un sistema sensorial bien desarrollado. Es uno de los tejidos más inervados y más sensibles en todo el cuerpo (Oyster, 1999).

La inervación corneal es importante para el correcto funcionamiento de la córnea, afectando varios procesos que incluyen sensación, proliferación, cicatrización de heridas, integridad epitelial, secreción de la película lagrimal y protección del ojo en su conjunto. La inervación del epitelio y de las capas del estroma permite que la córnea perciba la temperatura, el dolor y la presión (Ruberti *et al.*, 2014). La sensibilidad corneal a la presión mecánica es extremadamente alta, muchas veces mayor que la sensibilidad de la piel, y probablemente 10 veces mayor que la sensibilidad de las puntas de los dedos (Oyster, 1999).

En la córnea superficial, los nervios entran al estroma radialmente formando arreglos plexiformes que eventualmente perforan la membrana de Bowman para proveer un plexo debajo de la capa basal del epitelio. La córnea también contiene fibras nerviosas autónomas simpáticas (DelMonte y Kim, 2011).

Sin inervación sensorial adecuada, la córnea y el ojo están en mayor riesgo de daño por estímulos nocivos. Las alteraciones de la inervación en la córnea pueden conducir a una reducción de la película lagrimal, dando como resultado el síndrome del ojo seco, que puede resultar en úlceras corneales difusas (Ghezzi *et al.*, 2015).

Además, los nervios corneales son necesarios para ayudar a mantener la integridad de la superficie ocular mediante la liberación de factores como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la sustancia P que promoven la salud epitelial. Se sugiere que la inervación del epitelio limbar ayuda a mantener las células madre limbares y su nicho (Ruberti *et al.*, 2014).

Como se ha señalado a lo largo de esta sección, la visión depende de la discreta organización, estructura e integración funcional de las distintas capas que conforman la córnea. Cualquier cambio que altere la compleja estructura y organización de este tejido puede causar cicatrices y opacidades que menudo, son el resultado de la mayoría de las enfermedades y

lesiones corneales. La principal característica del tejido cicatricial es una alineación anormal de las fibrillas de colágeno, que está directamente asociada con la transparencia del tejido. El impacto de la formación de tejido cicatricial en el tejido corneal es significativamente mayor que en otros tipos de tejido ya que tiene impactos directos en la visión. La ceguera corneal es el resultado de la cicatrización y vascularización de la córnea, que si es grave es permanente (Wilson *et al.*, 2012). A continuación se describen las principales enfermedades y lesiones corneales que pueden conducir a la deficiencia visual e incluso ceguera permanente.

1.2 Enfermedades corneales

Las enfermedades que afectan a la córnea son vastas y diversas, la mayoría son el resultado de alguna forma de alteración de la disposición de fibrillas en la capa estromal. Son la segunda causa más importante de pérdida de la visión y ceguera irreversible, después de las cataratas. Afectan a más de 10 millones de personas en todo el mundo, sin contar los cientos más de millones afectados por la pérdida visual monocular. La definición de ceguera de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una agudeza visual de 3/60 o menos (Wilson *et al.*, 2012).

La ceguera corneal está generalmente relacionada con una pérdida de la transparencia, que dificulta u obstruye el paso de la luz. La epidemiología de la ceguera corneal es complicada y abarca una amplia variedad de enfermedades oculares infecciosas e inflamatorias que causan cicatrices corneales que en última instancia conducen a la ceguera funcional (Whitcher *et al.*, 2001).

Las principales causas de ceguera corneal incluyen: traumas, inflamación (queratitis), deposición de macromoléculas insolubles y opacas (distrofias corneales), disrupción de la capa epitelial (úlceras corneales), crecimiento excesivo de los vasos sanguíneos en la córnea (neovascularización corneal), pérdida de transparencia corneal debido a hinchazón de la córnea (Distrofia de Fuchs), cambios estructurales y adelgazamiento (queratocono y queratoglobos) y descompensación posterior a cirugías (queratopatía bullosa) (Dyrlund *et al.*, 2012; Verdigué *et al.*, 2017). En el cuadro 1 se proporciona un resumen de dichas causas.

Cuadro 1. Principales enfermedades y lesiones asociadas a la ceguera corneal

| Enfermedad | Características | Causas | Tratamiento | Otros datos |
|-------------------------------------|--|---|--|---|
| Queratitis | Inflamación del estroma corneal Defectos del epitelio corneal (ulceración) Pérdida de la transparencia corneal por cicatrización Dolor, enrojecimiento, lagrimeo, sensibilidad a la luz. Disminución de la visión | Infeciosas: Bacterianas (<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>) Fúngicas (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Candida</i>) Víricas (virus del herpes simple, herpes zóster) | Antibióticos Antifúngicos Corticosteroides tópicos Trasplante corneal | Es una de las causas más comunes de ceguera corneal. Producen entre 1.5 y 2 millones de nuevos casos de ceguera al año en todo el mundo. |
| Traumatismo ocular | Ulceración. Vascularización corneal Leucoma Perforación corneal Pérdida de visión unilateral. Ceguera. Globos rotos. | Traumatismo mecánico, partículas que entran en el ojo, quemaduras químicas y térmicas Actividades en el lugar de trabajo Accidentes de carretera. Accidentes domésticos. | Tratamientos antibióticos y antimicóticos, aunque el resultado visual suele ser pobre Trasplante de córnea. | Se están convirtiendo en una de las causas más frecuentes de cicatrización corneal y ceguera. |
| Distrofia endotelial de Fuch | Deterioro de las células endoteliales. Pérdida en la eficiencia del bombeo de agua del estroma Hinchazón y cambios en la curvatura de la córnea. Pequeñas ampollas en la superficie de la córnea. Sensibilidad a la luz. Por lo general, afecta a ambos ojos. | Enfermedad hereditaria con patrón autosómico dominante. Mutación genética fuertemente sospechada. | Soluciones salinas, tales como gotas de cloruro de sodio o ungüento para extraer líquido de la córnea y reducir la hinchazón. Lentes de contacto. Trasplante corneal | Éxito del trasplante a corto plazo, pero la supervivencia a largo plazo es un problema. No se puede curar. |
| Otras distrofias corneales | Anormalidad de una o varias capas de la córnea. Son bilaterales, relativamente simétricas, lentamente progresivas. Su aparición no depende de factores ambientales, inflamatorios o sistémicos. Causa disminución de la visión y erosiones | Origen genético o hereditario epigenético. | Dependiendo de la distrofia los tratamientos pueden ser: Gotas, ungüentos, lubricantes, lentes de contacto queratectomía fototerapéutica, queratectomía lamelar | Incluyen una amplia variedad de enfermedades que afectan la córnea. Dependiendo de la capa que afecten se clasifican en: Distrofias epiteliales |

| | | | | |
|-----------------------------|---|--|--|---|
| | epiteliales recurrentes y dolorosas. | | Trasplante de córnea total o parcial | Distrofias estromales Distrofias endoteliales |
| Queratocono | Ectasia corneal bilateral, progresiva, no inflamatoria Alteraciones de la red de fibras de colágeno Reducción focal del radio de curvatura de la córnea, reducción localizada del espesor corneal Pérdida de queratocitos y reducción del entrecruzado de colágeno. Disminución lenta y progresiva de la visión | Etiología probablemente multifactorial. Los factores genéticos y los traumatismos mecánicos debidos al frotamiento de los ojos y al uso de las lentes de contacto también pueden ser responsables del mayor riesgo de desarrollar queratocono | Lentes de contacto, entrecruzado de colágeno corneal, segmentos de anillos intraestromales Trasplante de córnea total o parcial | |
| Queratogloblo | Trastorno ectásico bilateral Adelgazamiento corneal no inflamatorio Protrusión globular de la córnea Visión pobre Algunos casos pueden presentar perforaciones corneales espontáneas o después de un traumatismo mínimo debido al extremo adelgazamiento y fragilidad de la córnea Acumulación de líquido en el estroma | Trastorno congénito presente desde el nacimiento aunque puede haber formas adquiridas de queratogloblo Hereditario autosómico recesivo | Corrección refractiva Lentes de contacto de vendaje, solución salina hipertónica tópica | La queratoplastia penetrante convencional en estos pacientes no es posible debido al adelgazamiento de la córnea y a la disparidad periférica del espesor de la interface injerto-huésped que impide el cierre adecuado de la herida. |
| Queratopatía bullosa | Edema corneal estromal en el que se producen vesículas subepiteliales debido al paso de fluido hacia las capas anteriores corneales desde un endotelio ineficaz y como consecuencia de la presión intraocular Disminución de la visión y dolor | Descompensación endotelial. | Sintomático (alivio del dolor) u óptico (Trasplante corneal) | Es una de las complicaciones más frecuentes producida por daño endotelial post-quirúrgico, agravada por la pérdida celular que ocurre durante el proceso de envejecimiento. |

(Pérez *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2014; Bourges, 2017; Wallang y Das, 2013; Verdiguél *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2013; Thomas y Geraldine, 2007; Weiss *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2005).

Hasta ahora, el tratamiento médico estándar para córneas con patologías avanzadas o lesiones significativas es el reemplazo del tejido enfermo o dañado a través de un trasplante de córnea, ya sea total o parcial (Duan et al., 2006).

1.3 Trasplante de córnea

El trasplante de córnea es el procedimiento de mayor éxito dentro de todos los trasplantes de órganos que se realizan en seres humanos. Consiste en remover la parte central de la córnea dañada y reemplazarla con una córnea transparente obtenida de un ojo donador. Puede ser de grosor parcial y se denomina queratoplastia lamelar, o de espesor total y se denomina queratoplastia penetrante (QP) (Secretaría de Salud, 2011)

La córnea fue el primer trasplante de tejido sólido exitoso; esto debido a que se trata de un tejido inmunológicamente privilegiado, pues es avascular y carece de canales linfáticos, células presentadoras de antígenos y de un ambiente inmunosupresor en el humor acuoso. Actualmente, la queratoplastia penetrante es considerada como la cirugía de trasplante de tejido realizada con mayor frecuencia en el mundo, así como la de mayor éxito (Verdiguel *et al.*, 2017)

En México, el trasplante de córnea ocupa el segundo lugar, después del trasplante de riñón. En este año se han reportado en el Sistema Informático del Registro Nacional de Trasplantes (SIRNT) 2916 trasplantes de córnea (CENATRA, 2017).

Se ha observado un incremento exponencial en el número de trasplantes de córnea, de acuerdo con cifras reportadas en el CENATRA. Del periodo de 1991 al 2005, los trasplantes de córnea prácticamente han duplicado su magnitud, para desacelerar su tendencia en los últimos diez años cuyo aumento fue de 19% (Figura 9).

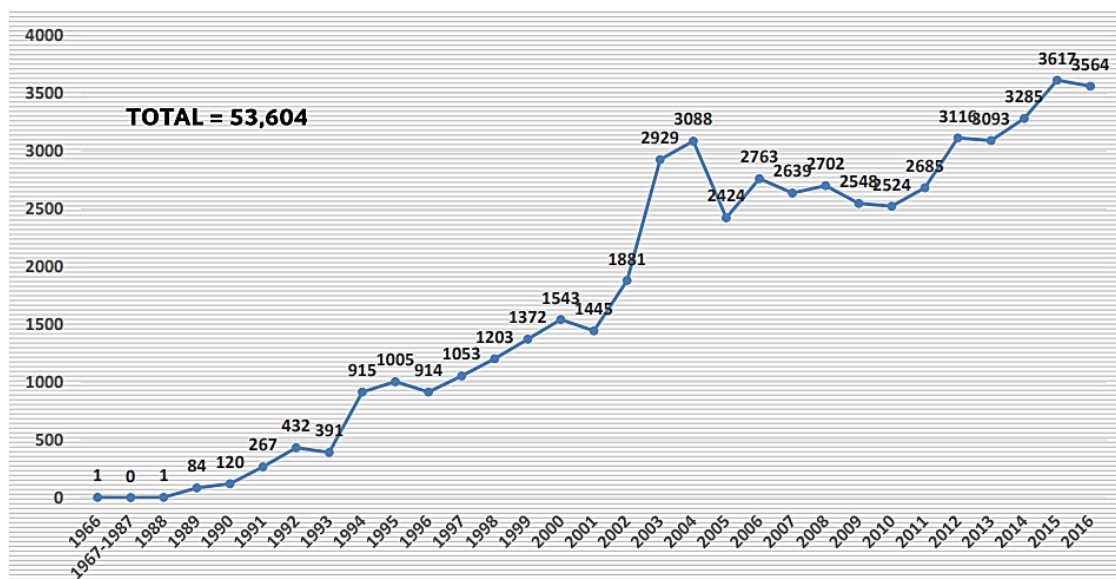


Figura 9. Trasplante de córnea histórico en México por año. El comportamiento que han tenido los trasplantes de córnea ha sido creciente, de 1966 a 2016, conforme el SIRNT se han realizado 53,604 trasplantes.

Aunque la córnea es el segundo tipo de tejidos más trasplantado en México, los programas de bancos de ojos no pueden satisfacer la demanda de trasplantes; por lo tanto, las largas listas de espera siguen siendo un factor limitante. A la fecha, hay un total de 7307 registros de la lista de espera de trasplante corneal. El tiempo promedio de espera para recibir un trasplante es de 8 meses (CENATRA, 2016).

La tasa de donación de órganos fue de 16.3 por millón de habitantes en 2015. Sin embargo países como España o Uruguay la tasa de donación es de 39 y 20 por millón respectivamente, lo que claramente muestra que la donación de órganos es para nuestro país un desafío por superar (CENATRA, 2016).

Las indicaciones de trasplante de córnea han cambiado con el tiempo y varían en función del país. Por ejemplo, la queratopatía bullosa parece ser la indicación más común de trasplante de córnea en los países desarrollados y las enfermedades infecciosas de córnea y las cicatrices corneales son más prevalentes en los países en desarrollo (Verdiguel *et al.*, 2017). En México, según el CENATRA las indicaciones más frecuentes de QP en el 2016 fueron queratocono, queratopatía bullosa y leucoma causado por quemaduras, traumas, queratitis infecciosa herpética y no herpética y ojo seco.

El trasplante corneal de repetición continúa siendo una indicación común de QP y repetirlo deteriora el pronóstico sobre la cirugía inicial, ya que comparte los factores de riesgo iniciales más los que se han adquirido desde el procedimiento original, como el incremento de edad, la elevación de la presión intraocular, el desarrollo de neovasos y el deterioro de la superficie ocular (Ghezzi *et al.*, 2015). Los diagnósticos más comunes para el trasplante de córnea primario que requieren de queratoplastias subsecuentes son la cicatriz corneal vascularizada que se produce como consecuencia de queratitis herpética, lesión ocular penetrante, quemaduras oculares por álcali; la queratopatía bulosa pseudofáquica, y en menor porcentaje el queratocono y las distrofias corneales (Verdiguel *et al.*, 2017).

El trasplante total de córnea tiene una tasa de éxito del 90% en pacientes con buenos pronósticos (baja vascularización e inflamación del injerto), pero casi ninguna posibilidad de éxito en pacientes con quemaduras alcalinas o fracasos recurrentes del injerto. El rechazo inmunológico sigue siendo, en la actualidad, la primera causa de fracaso de un trasplante de córnea. El mejoramiento de las técnicas quirúrgicas y del procesamiento del tejido donante, así como el rápido reconocimiento y manejo terapéutico del rechazo corneal, han llevado a obtener índices de hasta 95% de sobrevida sin embargo, más de un 30% de los trasplantes de córnea tienen al menos un episodio de rechazo y un 5-7% de todos ellos fracasan por esta causa (Secretaría de Salud, 2007).

Una vez que el proceso de rechazo del tejido comienza, el injerto corneal trasplantado puede tratarse médicamente con corticosteroides tópicos y si el rechazo del tejido continúa, el injerto corneal debe ser quirúrgicamente removido y reemplazado. Las tasas de rechazo del segundo implante pueden ser tan altas como 50%. El proceso de rechazo del tejido puede conducir a ceguera permanente (Ghezzi *et al.*, 2015).

Los factores con mayor riesgo para el rechazo son la edad del donador y la edad del receptor, así como la vascularización de la córnea. La neovascularización incrementa el riesgo de fracaso del injerto en 30%. En ocasiones, la causa del incremento de los vasos no se debe a la reacción del homoinjerto, sino a factores traumáticos quirúrgicos (irritación por sutura) o reactivación de la enfermedad primaria del receptor. La ausencia de vasos no es protección absoluta, pues a veces se producen reacciones del injerto en receptores perfectamente claros y sin neovascularización (Verdiguel *et al.*, 2017).

Rechazo corneal

El rechazo del injerto corneal es un proceso inmune complejo en el cual un injerto que ha estado transparente durante al menos 2 semanas sucumbe repentinamente al edema, en conjunción con signos inflamatorios del segmento anterior, lo que resulta en la descompensación de la córnea trasplantada que puede conducir a un daño reversible o irreversible del injerto (Figura 10) (Panda *et al.*, 2007)

La córnea normal es un sitio inmunológicamente privilegiado, este estado es mantenido por múltiples mecanismos que incluyen la expresión débil de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células corneales, la falta de células presentadoras de antígenos (APCs) en la córnea central, presencia de moléculas inmunomoduladoras en el humor acuoso y la expresión constitutiva del ligando Fas. Este privilegio puede perderse por inflamación y neovascularización que predisponen a un injerto corneal al rechazo (Williams y Coster, 2007).

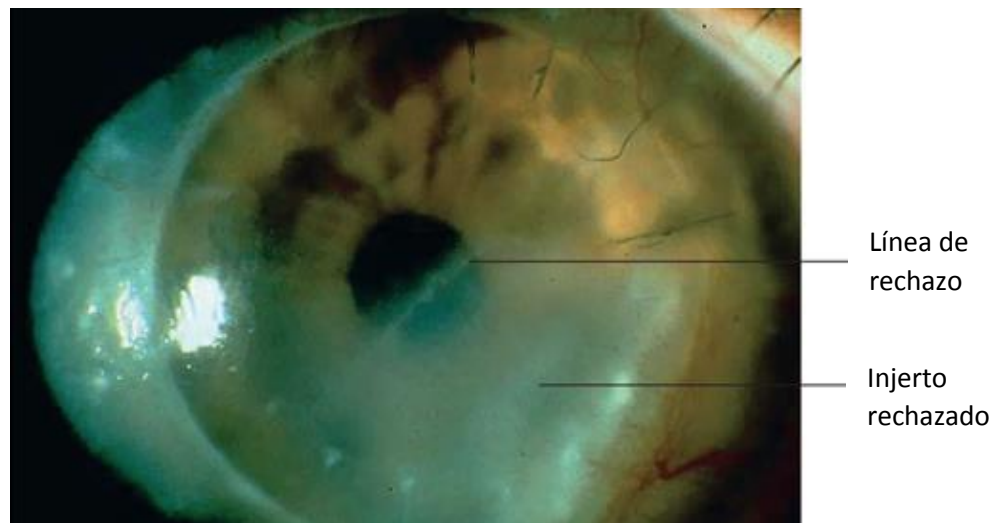


Figura 10. Manifestación clínica del rechazo del injerto corneal. Los monocitos infiltrantes y las células T atacan el injerto, a menudo con una línea de rechazo que cruza la capa endotelial interna del trasplante. Tomado de Amouzegar *et al.*, 2016.

El rechazo del injerto corneal es principalmente una respuesta mediada por células, controlada por las células T CD4 +. La inflamación induce el crecimiento de los vasos sanguíneos y linfáticos en la córnea. Los estímulos inflamatorios tienden a atraer a las APCs

hacia el estroma central de la córnea donde permanecen. El estímulo antigénico dominante para el rechazo del aloinjerto y la producción de anticuerpos son los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Éstos son glicoproteínas localizadas en la superficie celular. Existen dos clases de antígenos HLA, clase I y II, los antígenos de clase I se expresan en todas las células nucleadas del cuerpo incluyendo el epitelio corneal, los queratocitos del estroma y el endotelio. Los antígenos de clase II se encuentran selectivamente en linfocitos B, macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas. El interferón gamma (IFN-gamma) y la reacción inflamatoria aumentan la expresión de los antígenos de clase II (Panda *et al.*, 2007)

El reconocimiento por el sistema inmune del huésped de los antígenos de histocompatibilidad extraños en las células del aloinjerto corneal conduce a la iniciación de la cascada inmune (brazo de respuesta inmune aferente), lo que da lugar a sensibilización del huésped. En el proceso de sensibilización, estos antígenos donantes son procesados por APCs del huésped en la interface injerto-huésped. Los antígenos procesados se externalizan en las APCs y se presentan al sistema inmune del huésped junto con los HLA II e IL-1. La presentación de aloantígenos derivados de la córnea se puede producir dentro del mismo tejido, en los tejidos circundantes incluyendo la conjuntiva y los alrededores oculares, en los ganglios linfáticos locales o en el tejido linfoide secundario más distante (Williams y Coster, 2007). Los antígenos de clase I del donante son reconocidos por las células T citotóxicas del huésped (CD8+) y los antígenos de clase II del donante son reconocidos por las células T cooperadoras (Th) (CD4+) (Dua y Azuara-Blanco, 1999).

Aparentemente, el huésped se sensibiliza en una semana, pero es la capacidad de las células efectoras de alcanzar el injerto lo que se manifiesta en el fenómeno de rechazo. Las células Th activadas liberan IL-2, IFN-gamma, factor de activación de macrófagos (MAF), factor de inhibición de migración (MIF) y otras citocinas. La IL-2 estimula la activación y proliferación de otros linfocitos T y B. El IFN-gamma induce la expresión de antígenos de clase II, que son potentes estimuladores de la respuesta de rechazo. Los linfocitos T citotóxicos son las células efectoras primarias, que montan un ataque sobre las células que llevan el antígeno extraño. Los linfocitos B producen anticuerpos contra el antígeno extraño, que atraen células inflamatorias no específicas tales como los macrófagos, además de células involucradas en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los injertos de córnea con rechazo agudo se infiltran además con células T CD4+, células NK (natural killer) y

neutrófilos. De este modo se establece la cascada de eventos celulares mediada por inmunidad, los cuales necesitan ser controlados temprana y agresivamente para proteger la función del injerto. La respuesta del huésped montada contra el antígeno extraño constituye el brazo de respuesta inmune eferente de la cascada de rechazo (Panda *et al.*, 2007)

En resumen, después del aloinjerto corneal, las células inmunitarias pueden reconocer los antígenos HLA no propios, lo que conduce a la sensibilización del sistema inmunológico del huésped, que resulta en una reacción inmune y daño patológico. La sensibilización del huésped se debe en gran medida a las células presentadoras de antígenos donantes que llevan moléculas de HLA-II extrañas y capaces de activar células T en reposo del huésped. La activación de células T cooperadoras CD4 + conduce a la activación y producción de células T citotóxicas CD8 +. Estas células atacan específicamente las células donantes que portan HLA-I y el antígeno sensibilizante. Esto puede incluir células epiteliales, estromales y endoteliales (Dua y Azuara-Blanco, 1999).

Aunque la tasa de éxito del trasplante corneal es alta, aproximadamente el 80% de las córneas mantienen la transparencia 2 años después del procedimiento, este número disminuye hasta el 65% 5 años después de la cirugía. Las tasas de rechazo agudo oscilan entre 13.3 y 65% dentro de los 4 meses después de la queratoplastia, y el rechazo puede ocurrir muchos años más tarde. Con ciertas enfermedades, incluyendo las cicatrices corneales y el queratocono, el pronóstico es excelente; sin embargo, otras enfermedades como quemaduras alcalinas, ojo seco severo, trastornos inmunológicos, deficiencia de células madre, vascularización y cicatrices secundarias a la queratitis herpética, no son capaces de soportar los trasplantes de córnea. En algunos casos de rechazo repetido del injerto, la tasa de éxito de futuros trasplantes cae cerca de cero (Duan, *et al.*, 2006).

La obtención de córneas de alta calidad se basa en un sistema de banco de ojos muy bien administrado que no está disponible universalmente. Sumado al costo y las limitaciones del trasplante de córnea está la necesidad de exámenes toxicológicos extensos y caros que son necesarios para prevenir la propagación de patógenos. Esto se agrava aún más por el problema de la calidad del donante, que disminuye a medida que la población de donantes envejece debido a la disminución de la función del endotelio corneal. Además, el auge de la cirugía refractiva utilizada para mejorar la visión alterando la forma de la córnea, hacen que ésta no sea apta para la donación. Por último, los factores religiosos y culturales limitan el

alcance de la donación de órganos y por lo tanto la disponibilidad de las córneas para trasplante (Ruberti et al., 2014).

Por todo lo anterior, es necesario el desarrollo de equivalentes corneales como una alternativa al trasplante de córnea de donadores cadavéricos. En este sentido, la ingeniería de tejidos proporciona herramientas que permiten crear nuevas alternativas y soluciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades corneales.

1. 4 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido (Langer y Vacanti, 1993). Las células, los andamios y los factores de crecimiento, denominados generalmente la tríada de la ingeniería de tejidos, son los componentes clave de esta disciplina (Chan y Leong, 2008). Técnicamente hablando, es la generación de un tejido mediante la siembra de células específicas aisladas de una biopsia del paciente en un soporte (andamio) y cultivándolas en un entorno dinámico para que las células proliferen con o sin presencia de factores de crecimiento y/o diferenciación, con el objetivo de formar eventualmente un tejido que imite las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del tejido natural lo más cerca posible (Wilson *et al.*, 2012).

Con respecto a la ingeniería de tejidos en córnea, hay muchos desafíos que deben abordarse, entre otros, el hecho de que la estructura de la córnea es única y difícil de replicar. Dos desafíos fundamentales en la IT corneal son el mantenimiento del fenotipo de las células estromales aisladas (queratocitos) y la replicación de la arquitectura del colágeno. Si ambos factores no se satisfacen, el resultado suele ser un tejido que imita al tejido cicatricial (Wilson *et al.*, 2012).

La córnea es una estructura increíblemente bien diseñada que tiene tanto alto poder refractivo y alta resistencia a la tracción, todo mientras que es ópticamente transparente. Sus dos funciones principales, la refracción de la luz y la protección del ojo, son difíciles de lograr simultáneamente a partir de métodos de ingeniería de tejidos. Para superar estos desafíos, se han adoptado dos enfoques básicos: estrategias basadas en células,

manipulándolas para que creen su propia matriz extracelular y las estrategias basadas en andamios para proporcionar matrices sólidas y transparentes sobre las que crezcan las células (Shah et al., 2008).

Enfoques basados en células

En este enfoque las células del estroma se proveen con los nutrientes y factores apropiados para inducir la producción de láminas de colágeno y otras macromoléculas de matriz extracelular. Estas láminas se colocan juntas para recrear el estroma corneal (Griffith *et al.*, 2011)

Los estudios han demostrado que el ácido ascórbico puede aumentar la proliferación de fibroblastos y estimular la secreción de colágeno de las células del estroma (Shah *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado que los fibroblastos corneales cultivados en medio suplementado con ácido ascórbico son capaces de ensamblar una matriz tridimensional compuesta de fibras de colágeno paralelas, similares a las encontradas en la córnea humana. Sin embargo, el diámetro promedio de las fibras producidas es más grueso que el del estroma corneal natural, lo que sugiere la necesidad de investigar más a fondo los estímulos celulares para reducir el tamaño del diámetro de las fibrillas. El constructo resultante obtenido mediante esta técnica es bastante transparente; sin embargo, hasta ahora sólo se ha logrado obtener únicamente una fracción del grosor total de una córnea (Griffith y Harkin, 2014). Estas investigaciones muestran el potencial de aprovechar las células para auto-ensamblar una matriz corneal; sin embargo, son necesarios más estudios para determinar los límites de espesor de tal constructo, así como para evaluar las propiedades mecánicas y ópticas del tejido (Shah *et al.*, 2008).

Más recientemente, se ha reportado el uso de ácido ascórbico para inducir la secreción de MEC por células madre de cordón umbilical para formar un constructo parecido al estroma de la córnea. Las células madre de cordón umbilical son capaces de diferenciarse en células tipo estromales y en comparación con los fibroblastos de la córnea humana, producen una matriz más extensa. Sin embargo, a pesar de la capacidad de las células madre del cordón umbilical para producir un estroma, tomó 4 semanas producir un constructo que tenía 24 mm de diámetro y 30 μm de espesor. Por lo tanto, el inconveniente principal es el largo período requerido para la fabricación de un constructo (Griffith y Harkin, 2014).

Otros estudios en los que se han sembrado fibroblastos estromales en matrices de colágeno con diferentes propiedades mecánicas sugieren que la señalización mecánica podría inducir a las células del estroma corneal a producir una matriz de colágeno alineada que se aproxime a la de la córnea nativa. Alternativamente, se han desarrollado constructos organizados de nanofibras de colágeno tipo I por medio de electrohilado para proporcionar orientación espacial a los fibroblastos corneales, aunque se ha observado que esto reduce la transparencia del constructo (Ghezzi *et al.*, 2015). Estos estudios indican el creciente interés en los estímulos mecánicos que influyen en el desarrollo del tejido corneal (Shah *et al.*, 2008).

La complejidad de producir capas de laminillas a base de colágeno para generar un estroma transparente y fuerte requiere tiempo y avances tecnológicos. La complejidad de la organización global y local de las fibrillas de colágeno en el estroma hacen que esta capa sea difícil de replicar mediante este enfoque (Ruberti *et al.*, 2014).

Enfoques basados en andamios

El otro enfoque principal en la ingeniería de tejidos en córnea implica el diseño de un nuevo sustrato sobre el cual crecer las células.

El objetivo primordial del desarrollo de un andamio para ingeniería de tejidos es imitar la MEC nativa a través de su estructura y composición. Mediante la incorporación de los aspectos químicos y estructurales de la MEC, los andamios promueven la adhesión y proliferación celular, proveen señales biológicas, permiten la transferencia de nutrientes y proporcionan características mecánicas y biológicas que pueden influenciar la función celular. Por lo tanto, la MEC es el punto de referencia sobre el cual se sostiene el diseño del andamio (Smith y Ma, 2011).

Debido a la biocompatibilidad y estabilidad del tejido, los materiales son un factor importante en el desarrollo de un equivalente corneal (Wang *et al.*, 2013). Se han utilizado diversos biomateriales para la IT corneal. Estos biomateriales deben ser ópticamente transparentes, biocompatibles, mecánicamente estables y permitir que las células se adhieran, proliferen y migren. Deben ser lo suficientemente fuertes para soportar la manipulación en cultivo, la sutura potencial, la irrigación y la manipulación en cirugía.

También tienen que poder producirse fácilmente con una calidad consistente, preferiblemente a alta velocidad y bajo costo (Wilson *et al.*, 2012).

Cualquier biomaterial debe reemplazar la función protectora de la córnea proporcionando tanto una barrera adecuada para la entrada de patógenos como propiedades mecánicas lo suficientemente estables para proteger el frágil contenido intraocular contra insultos moderados. Además, dependiendo del espesor del constructo, el material también debe reemplazar el papel de bloqueo de rayos UV del estroma corneal y el epitelio. También deben proporcionar una superficie curva apropiada y un índice de refracción para proporcionar la potencia óptica necesaria (~ 45 dioptrías) (Ruberti *et al.*, 2011).

La membrana amniótica, el colágeno, la fibrina, el quitosán, los andamios de nanofibras de polímeros sintéticos, se encuentran entre los materiales investigados como sustratos corneales (Cuadro 2). Los materiales que se han utilizado con mayor frecuencia para construir sustitutos corneales son el colágeno tipo I y la fibrina (Duan *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos en córnea

| Material | Usos | Ventajas | Desventajas |
|---------------------------|---|--|---|
| Colágeno | Se ha utilizado en geles, esponjas y películas para crear un equivalente de estroma corneal | El ambiente proporcionado por el andamio de colágeno es cercano a las condiciones fisiológicas. Puede promover la adhesión celular y la proliferación mejor que los polímeros sintéticos | Malas propiedades mecánicas y rápida degradación <i>in vivo</i> , no permite la infiltración de queratocitos (aunque pueden ser sembrados antes de la preparación). Contracción extensa cuando se siembra con queratocitos antes de la polimerización, lo que podría limitar su capacidad para promover la cicatrización de heridas y la transparencia dentro del ojo. Las fibras de colágeno dentro de las películas son significativamente mayores que las que se encuentran dentro de la córnea. Algunos modelos no son lo suficientemente fuertes como para soportar la implantación. Las células cultivadas muestran cambios fenotípicos característicos de los miofibroblastos. |
| Membrana amniótica | Como sustratos para la expansión <i>in vitro</i> del epitelio corneal y para la reconstrucción de córneas dañadas en varios modelos animales (por | Inercia inmunológica, promueve el crecimiento de las células epiteliales de la córnea, inhibe la respuesta inflamatoria, la cicatrización y la angiogénesis | La variabilidad inter e intra tejido de las propiedades morfológicas, químicas y ópticas limita el uso de la membrana amniótica humana en entornos clínicos. Estudios han mostrado que las córneas de conejos tratadas con membrana amniótica desarrollaron defectos epiteliales que resultaron en la desintegración de la membrana amniótica e inflamación. |

| | | | |
|-----------------------------|--|--|--|
| | ejemplo, rata, conejo y cabra) | | |
| Fibrina | Se ha utilizado para sintetizar geles que puedan ser utilizados como sustituto estromal | Precio bajo, disponibilidad y buena tolerancia a las células Los geles de fibrina no son contraídos por las células del estroma | Tiene un arreglo desordenado de estructuras microfibrilares por lo que es menos fuerte que la estructura natural de la córnea |
| Quitosa | Películas para la reconstrucción de la superficie anterior | Las películas de quitosa tiene buena transmitancia de luz y resistencia mecánica | Tienen un gran número de grupos amino en la superficie de las películas que pueden inhibir la proliferación de las células, por lo que se requiere mejorar la biocompatibilidad |
| Fibroína | Se han utilizado membranas, fibras y esponjas porosas para la reparación de heridas corneales | Buena flexibilidad y resistencia a la tracción, permeabilidad al aire Alto grado de transparencia Soporta la adhesión, crecimiento y diferenciación de células aisladas del tejido corneal | No posee motivos estructurales específicos para promover la unión celular y el crecimiento, por lo que requiere de recubrimiento con componentes de MEC purificados o péptidos para lograr la adhesión celular. |
| Polímeros sintéticos | Algunos de los polímeros utilizados son: polidimetilsiloxano (PDMS), polietilenglicol (PEG), ácido poliacrílico, ácido poliglicólico (PGA) y alcohol polivinílico Se han procesado en forma de fibras micro y nanométricas que permitan dirigir la organización y diferenciación de las células del estroma <i>in vitro</i> , | Son citocompatibles, transparentes, permeables al oxígeno Abordan algunas de las limitaciones del colágeno; no se contraen en presencia de células y tienen propiedades de degradación más estables | Aún carecen de propiedades ópticas adecuadas En general, las propiedades del tejido nativo no se duplican fácilmente con materiales sintéticos, ya que las células no reconocen las superficies, por lo que no se adhieren. |

(Wang *et al.*, 2013; Ghezzi *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2006; Griffith y Harkin, 2014; Alaminos *et al.*, 2006).

Aunque se han evaluado diferentes tipos de andamios y se han desarrollado sustitutos artificiales que parcialmente imitan la córnea humana, hasta la fecha no se ha logrado obtener un constructo corneal funcional de espesor total debido a problemas relacionados

con la biocompatibilidad y propiedades mecánicas u ópticas, además de que existen desventajas de cultivo celular, rechazo primario, citotoxicidad y biocompatibilidad (Alaminos *et al.*, 2006). Por consiguiente, una nueva estrategia para preparar un andamio es el uso de tejido xenogénico descelularizado (Oh *et al.*, 2009).

Estroma corneal descelularizado

Los andamios derivados de tejidos y órganos descelularizados se han utilizado con éxito tanto en estudios preclínicos en animales como en aplicaciones clínicas humanas. Las MEC acelulares procesadas a partir de tejidos xenogénicos son los andamios que mejor simulan el tejido nativo, se han utilizado en la ingeniería de diversos tejidos, incluyendo válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, nervios, tendones y ligamentos (Chan y Leong, 2008).

La principal ventaja de estos andamios son las propiedades mecánicas y biológicas más cercanas a la MEC nativa. Además de la excelente biocompatibilidad, los factores de crecimiento preservados en la matriz descelularizada pueden facilitar aún más el crecimiento celular y la remodelación (Chen *et al.*, 2015).

El uso de estos andamios garantiza importantes interacciones célula-matriz extracelular que median la organización y remodelación del tejido. Proporciona el mejor reconocimiento celular entre todos los andamios al preservar la composición estructural, los niveles adecuados de integridad mecánica del tejido y las moléculas bioactivas que activan las comunicaciones célula-célula, la adhesión a la matriz celular y la nueva formación de la MEC (Rana *et al.*, 2017)

Teniendo en cuenta esta situación, el estroma corneal de animales como el cerdo puede ser un buen candidato para la generación de andamios para su uso en ingeniería de tejidos. La córnea porcina tiene propiedades refractivas y tamaño similares al tejido humano (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación morfológica de la córnea humana y porcina. (Tomado de Hara y Cooper, 2012.)

| | | <i>Humano</i> | <i>Cerdo</i> |
|--|-------------------|---------------|--------------|
| <i>Diámetro (mm)</i> | <i>Horizontal</i> | 11.7 | 14.9 |
| | <i>Vertical</i> | 10.6 | 12.4 |
| <i>Grosor (μm)</i> | <i>Central</i> | 536 | 666 |
| | <i>Periférico</i> | 593 | 714 |
| <i>Poder refractivo (dioptrías)</i> | | 43.0 | 40.4 |
| <i>Resistencia a la tracción (MPa)</i> | | 3.81 | 3.70 |

Los estromas corneales porcinos son adecuados como andamios para generar sustitutos corneales, ya que no están limitados por la disponibilidad de donantes y es similar a la córnea nativa en estructura (Figura 11), resistencia y transparencia (Wang *et al.*, 2013; Lynch y Ahearne, 2013). Los estromas descelularizados de origen porcino conservan la estructura espacial tridimensional de la matriz extracelular del tejido nativo, preservan las proteínas estructurales y funcionales de la MEC, el micro-ambiente es cercano al estado fisiológico y permite la adhesión celular, migración y proliferación (Wang *et al.*, 2013).

En este enfoque, las células y los antígenos del donante se eliminan por completo, disminuyendo así la reacción inmune del huésped y se realiza una repoblación de la matriz con las células receptoras (Machera y Galilic, 2008).

Debido a la deficiencia de membranas lipídicas, antígenos asociados a membrana y proteínas solubles, la inmunogenicidad disminuye significativamente (Wang *et al.*, 2013). El principal epítipo inmunogénico que causa el rechazo inmunológico de xenoinjertos es el epítipo α -gal.

El epítipo α -gal ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc-R}$) es una estructura que se encuentra en glicolípidos y glicoproteínas de mamíferos no primates y monos del Nuevo Mundo, es abundantemente sintetizado por la enzima de glicosilación $\alpha 1,3$ galactosiltransferasa ($\alpha 1,3$ GT). En humanos, simios y monos del Viejo Mundo, este epítipo está ausente porque el gen $\alpha 1,3$ GT fue inactivado en primates ancestrales del Viejo Mundo. Sin embargo, los seres humanos producimos un anticuerpo natural para este epítipo, el anticuerpo anti-Gal. Este anticuerpo constituye aproximadamente el 1% de las inmunoglobulinas circulantes (es

el anticuerpo más abundante en seres humanos). Se sugiere que el anti-Gal se produce en seres humanos como resultado de la estimulación antigénica continua por bacterias de la flora gastrointestinal normal (Galili, 2015)

Debido a que los epítomos α -gal se expresan abundantemente en células de mamíferos no primates, incluyendo cerdos, anti-Gal ha funcionado como una barrera inmunológica, impidiendo el trasplante de órganos de cerdo en seres humanos, mediante la unión del anticuerpo anti-Gal a los epítomos α -gal. La unión del anticuerpo anti-Gal con el epítomo α -Gal contribuye a la cascada del complemento, lo que conduciría al colapso del lecho vascular del xenoinjerto y al rechazo hiperagudo, que es el principal obstáculo en el xenotrasplante (Galili, 2005; Machera y Galilic, 2008; Huai *et al.*, 2016).

El proceso de descelerización elimina los antígenos celulares xenogénicos de los tejidos, que son fuentes de inmunogenicidad tras la implantación, pero mantiene los componentes de la MEC, que se conservan entre especies y por lo tanto son bien tolerados inmunológicamente. Se han desarrollado técnicas de descelerización especializadas para eliminar los componentes celulares y esto se logra usualmente mediante la combinación de métodos físicos, químicos y enzimáticos (Chan y Leong, 2008).

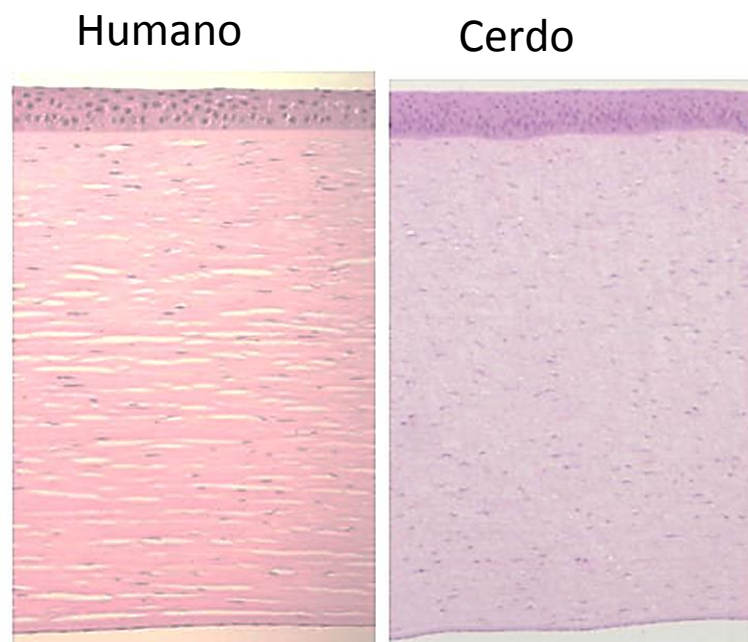


Figura 11. Comparación de la estructura histológica de la córnea en humanos y cerdos. Tomada de Hara y Cooper, 2012.

Métodos de descelularización

El proceso de descelularización o desvitalización implica la eliminación de material nuclear y celular de un tejido, mientras al mismo tiempo se preservan las proteínas estructurales y funcionales de la matriz extracelular. Esta técnica nos permite utilizar el tejido xenogénico como un andamio natural para la ingeniería de tejidos (Rana *et al.*, 2017).

El protocolo de descelularización ideal debe eliminar completamente el material celular y las moléculas inmunogénicas del xenoinjerto para disminuir la respuesta inmune del huésped, debe conservar las proteínas estructurales y funcionales de la MEC sin alterar la matriz tisular global, se debe mantener la transparencia corneal y soportar el crecimiento de las células corneales. La complejidad y duración del protocolo de descelularización están correlacionadas con el grado de conservación estructural y biológica requerido para el tejido post-procesado. Todos los métodos de descelularización resultan en alguna alteración de la ultraestructura de la MEC; sin embargo, la optimización del proceso de descelularización debe tratar de minimizar estos efectos indeseables. Para lograr una descelularización completa se utilizan con frecuencia combinaciones de métodos físicos, químicos y enzimáticos (He y Callanan, 2013).

Se han descelularizado córneas porcinas con éxito mediante una variedad de métodos, incluyendo el uso de detergentes, soluciones hipotónicas e hipertónicas, agentes enzimáticos y no enzimáticos, etc. (Lynch y Ahearne, 2013).

Métodos físicos

Los tratamientos físicos incluyen procesos de agitación, presión y congelación/descongelación que sirven para lisar las células y facilitar el lavado y eliminación del contenido celular. Los ciclos de congelación/descongelación actúan formando cristales de hielo intracelulares durante el proceso de congelación que interrumpen la membrana plasmática permitiendo que el contenido celular sea liberado. Los ciclos de congelación/descongelación son usualmente seguidos por etapas de lavado para eliminar cualquier residuo celular de la MEC (Lynch y Ahearne, 2013).

La agitación mecánica se usa normalmente en conjunto con tratamientos químicos y enzimáticos para inducir la lisis celular permitiendo a los agentes descelularizantes alterar

el material celular y nuclear. En la mayoría de los casos, la agitación mecánica se realiza con la ayuda de un agitador orbital o giratorio (Lynch y Ahearne, 2013).

Métodos químicos

Ácidos y bases

Los tratamientos con ácidos o bases se usan a menudo en combinación con otros métodos tales como detergentes y alcoholes. Estos agentes pueden causar o catalizar la degradación hidrolítica de las biomoléculas. Uno de los ácidos utilizados para descelularizar tejidos es el ácido peracético (PAA), este actúa eliminando los ácidos nucleicos residuales, causando un efecto mínimo sobre la estructura y composición de la MEC. Bases como el hidróxido de amonio pueden destruir eficazmente las membranas celulares y los organelos intracelulares (Lynch y Ahearne, 2013).

Detergentes

Los detergentes utilizados en protocolos de descelularización son surfactantes intermedios, usados para romper las membranas celulares y liberar el contenido intracelular solubilizado. Los detergentes rompen las interacciones entre proteínas, entre proteínas y lípidos, y entre lípidos y desnaturalizan proteínas y otras macromoléculas (Johnson, 2013).

Se han utilizado detergentes iónicos y no iónicos en protocolos de descelularización con diferentes grados de éxito. Los detergentes iónicos, tales como el dodecil sulfato de sodio (SDS), son extremadamente eficaces en la solubilización de las membranas celulares, pero pueden provocar la desnaturalización de las proteínas, lo que a su vez afecta la estructura de la MEC. El SDS es un tensoactivo aniónico utilizado para la lisis celular. La carga negativa del SDS contribuye a la hinchazón del tejido debido a la unión creciente del agua, lo que provoca disminución en el contenido global de GAG, daño a la membrana basal y disrupción de las fibrillas de colágeno debido a esta hinchazón (Lynch y Ahearne, 2013).

Los detergentes no iónicos tienen grupos terminales hidrofílicos no cargados. Generalmente se considera que los detergentes no iónicos son leves y relativamente no desnaturalizantes ya que rompen las interacciones entre lípidos y proteínas y entre lípidos, pero no las interacciones entre proteínas, por consiguiente, las proteínas son solubilizadas y aisladas en su estado nativo y activas (Johnson, 2013). Esto permite que las proteínas de membrana se solubilizan sin afectar las proteínas estructurales de la MEC. El Triton-X100 es el detergente no iónico más utilizado en la descelularización corneal. El Triton-X100 elimina eficazmente

los componentes celulares del estroma corneal mientras se conservan las estructuras de fibrillas de colágeno (Gilbert et al., 2006)

Tratamientos hipotónicos e hipertónicos

El tratamiento con agua desionizada y soluciones de cloruro de sodio puede hacer que las células lisen dentro de un tejido u órgano. La descelularización con NaCl en agitación continua mantiene la orientación de las fibrillas de colágeno y la distribución de proteoglicanos, pero no elimina los restos nucleares. Algunos protocolos han sido adaptados para incluir nucleasas que ayudan a la descelularización completa de la córnea, preservando al mismo tiempo la matriz corneal y la membrana basal epitelial. Las nucleasas tales como DNasa y RNasa escinden secuencias de ácidos nucleicos y pueden ayudar en la eliminación de nucleótidos después de la lisis celular (Lynch y Ahearne, 2013).

Agentes quelantes

Los agentes quelantes, como el EDTA, forman un complejo molecular en forma de anillo que se une firmemente y aísla un ion metálico central. Al unir los cationes divalentes que están presentes en los sitios de adhesión celular de la MEC lo que provoca la disociación celular, así estos agentes facilitan la eliminación del material celular del tejido. Los agentes quelantes se usan a menudo en combinación con otros agentes descelularizantes como tripsina o SDS. Las córneas descelularizadas con este método tienen un contenido de ADN significativamente reducido y un estroma con fibrillas de colágeno ordenadas. El EDTA se ha utilizado con éxito en conjunto con tratamientos hipertónicos e hipotónicos para reducir la inmunogenicidad de la córnea porcina, preservando al mismo tiempo la estructura de colágeno nativo (Gilbert *et al.*, 2006).

Métodos biológicos

Los agentes enzimáticos, como nucleasas, se usan rutinariamente en combinación con otros métodos para lograr una descelularización completa. Se pueden utilizar otras enzimas antes del proceso de descelularización, éstas incluyen dispasa y tripsina. La dispasa II, una proteasa neutra bacteriana, actúa para remover el epitelio corneal y el endotelio. La tripsina es una serina proteasa y se ha utilizado como paso preliminar en la descelularización para alterar la MEC de la córnea y mejorar la infiltración de agentes descelularizantes. Un método alternativo de eliminación de células implica el uso de sueros humanos. Se sabe que el suero contiene nucleasas que pueden causar la degradación del ADN y ARN (Lynch y Ahearne, 2013).

II. ANTECEDENTES

Con el fin de lograr con éxito un sustituto corneal mediante ingeniería de tejidos, se requiere lograr con éxito el cultivo de queratocitos que proliferen en condiciones de cultivo y al mismo tiempo conserven la mayoría de sus características *in vitro*. El cultivo de células corneales es problemático y las condiciones óptimas de cultivo deben definirse y optimizarse. Ya se ha establecido que los queratocitos difieren de los fibroblastos y los miofibroblastos en morfología celular, proliferación y expresión de proteínas. Los cambios fenotípicos ocurren cuando una célula se vuelve fibroblástica y se ha demostrado que es difícil revertir tales cambios cuando se cultivan queratocitos *in vitro*. Algunos estudios han sugerido que es posible cultivar queratocitos que conserven su fenotipo.

Foster *et al.*, (2014) investigaron los efectos de la glucosa en el fenotipo de queratocitos a través del análisis de la morfología celular, proliferación y expresión de marcadores específicos de queratocitos (queratocan, lumican, ALDH1). Este trabajo aborda la teoría de que, al recrear el entorno pobre en nutrientes del estroma corneal normal *in vitro* (es decir, utilizando condiciones bajas de glucosa), es posible mantener las células del estroma corneal con un fenotipo más cercano al observado en el tejido nativo. Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa en los diferentes parámetros, los queratocitos se mantuvieron en tres condiciones de cultivo durante 21 días: medio DMEM libre de suero bajo en glucosa, medio DMEM libre de suero alto en glucosa y medio basal (DMEM con 5% de suero fetal bovino).

Foster *et al.*, obtuvieron que la morfología de las células cultivadas en los tres medios mostró diferencias pronunciadas. Las células en condiciones libres de suero adquirieron una morfología dendrítica. En contraste, las células cultivadas en medio basal presentaban una morfología fusiforme característica de fibroblastos. Estas células mostraron la mayor tasa de proliferación, incluso continuaron proliferando después de alcanzar la confluencia, en cambio, las células en medio alto en glucosa dejaron de proliferar al día 7 en cultivo. Las células en medio bajo en glucosa proliferaron menos que las células en medio basal.

En relación al fenotipo, las células cultivadas en ausencia de suero mostraron un aumento en la expresión de queratocan, lumican y ALDH1 en comparación con las células en medio basal, pero esta expresión no se alteró debido a las concentraciones de glucosa, ya que la

expresión de estos marcadores fue similar entre el medio alto en glucosa y el medio bajo en glucosa. Las células en medio bajo en glucosa mostraron ausencia de α SMA y fibras de estrés en comparación con las condiciones de alta glucosa; además recuperaron la capacidad de expresar un marcador característico de queratocitos, CD34. En cuanto a migración celular, observaron que se redujo en el medio bajo en glucosa en comparación con las condiciones de alta glucosa. Al día 7, las células en medio bajo en glucosa ocuparon una superficie libre de células significativamente menor en comparación con las condiciones de alta glucosa o medio basal.

En conclusión, el estudio de Foster *et al.*, mostró que las células del estroma corneal son sensibles a la concentración extracelular de glucosa, y que los bajos niveles de este metabolito conducen al mantenimiento de muchos rasgos fenotípicos característicos de los queratocitos residentes en córneas sanas. Esta respuesta a la concentración de glucosa concuerda con la hipótesis de que el estroma corneal es particularmente pobre en nutrientes y que, al recapitular este entorno *in vitro*, es posible mantener la viabilidad celular durante períodos prolongados en cultivo.

Investigaciones anteriores también han afirmado que es posible desdiferenciar los fibroblastos corneales de nuevo a su fenotipo de queratocitos. Lynch *et al.*, (2016) investigaron la capacidad de las células estromales corneales que se han vuelto fibroblásticas para revertir su fenotipo y comportarse como los queratocitos que sintetizan una MEC específica de la córnea, utilizando un medio libre de suero químicamente definido. Además, se examinó la influencia de los diferentes factores de crecimiento que se sabe modulan el comportamiento de las células corneales (IGF-1, TGF- β 1 y TGF- β 3). Dado que los queratocitos existen dentro de un entorno tridimensional altamente organizado, las células se cultivaron tanto en cultivo en monocapa como en hidrogeles de colágeno. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la restauración de un fenotipo tipo queratocito en fibroblastos corneales expandidos inicialmente en suero y cultivados posteriormente en un medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento en entornos de cultivo 2D y 3D.

Lynch *et al.*, examinaron los marcadores específicos de queratocitos, queratocan y ALDH3A1, y los específicos de un fenotipo fibrótico, α SMA y colágeno tipo III. Se evaluaron los efectos de los medios libres de suero, los factores de crecimiento y el sistema de cultivo sobre la proliferación celular, la morfología y la síntesis de MEC. Los resultados obtenidos

fueron que cuando se cambió el medio de cultivo al medio libre de suero, las células mostraron una reducción no significativa en la proliferación y la síntesis de MEC, además de una disminución significativa en la capacidad de migración. Los medios sin suero promovieron una mayor expresión de queratocan y colágeno tipo I. Sin embargo, no hubo cambios significativos en la expresión de ALDH3A1 y α SMA, mientras que la expresión de colágeno tipo III aumentó significativamente. Las células conservaron una morfología fibroblástica alargada. En monocapa, el medio suplementado con TGF- β 1 y TGF- β 3 dio como resultado una expresión reducida de queratocan, ALDH3A1 y colágeno tipo I y tipo III, aumento de la expresión de α SMA y un aumento de la proliferación celular y síntesis de MEC. Las células cultivadas en hidrogeles de colágeno no aumentaron la expresión de los marcadores de queratocitos en condiciones libres de suero. Estos resultados demuestran que los fibroblastos corneales expresan parcialmente las características fenotípicas de los queratocitos cuando se cultivan en medio libre de suero. Si bien los factores de crecimiento no mejoraron significativamente este fenotipo, parece ser que el cultivo en 3D podría ser más beneficioso para promover un fenotipo de queratocitos.

III. JUSTIFICACIÓN

La córnea puede ser dañada por diversas enfermedades, traumas y lesiones que pueden causar deficiencia visual e incluso ceguera. La ceguera resultante de las enfermedades o lesiones corneales afecta a millones de personas en todo el mundo, siendo la segunda causa de pérdida de la visión, después de las cataratas. Hasta ahora, el único tratamiento para el daño corneal irreversible es el trasplante de córnea. A pesar de ser el tratamiento de mayor éxito para revertir esta condición, el suministro limitado y la calidad variable de las córneas donadas sigue siendo un problema significativo. Las limitaciones en la donación de órganos, que pueden ser culturales, logísticas o técnicas, hacen que la adquisición y entrega de injertos de calidad no sea posible en la mayoría de los casos tratables con un trasplante. Además, este acceso a injertos de donantes está aún más limitado por el creciente aumento en los procedimientos quirúrgicos LASIK, que comprometen la biomecánica estromal y descalifican el tejido donante para el trasplante. De modo que, el tejido donante no está disponible para la mayoría de los individuos en el mundo. Aunado a esto, existen complicaciones resultantes del procedimiento, como rechazo del injerto y neovascularización corneal. En consecuencia, es necesario el desarrollo de soluciones alternativas al trasplante corneal, como equivalentes de córnea fabricados mediante el empleo de los principios de la ingeniería de tejidos que puedan ser empleados en el tratamiento de las enfermedades y lesiones corneales.

IV. HIPÓTESIS

Si el proceso de decelularización del estroma corneal con el uso de Triton-X100 preserva las propiedades histológicas del tejido, cuando se siembren sobre el células estromales corneales previamente mantenidas en cultivo, estas serán capaces de adherirse y recuperar su fenotipo quiescente de queratocito.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

En células estromales corneales mantenidas en cultivos tanto bidimensionales, como sembradas sobre los estromas corneales desvitalizados, evaluar la viabilidad, proliferación y activación.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener un andamio desvitalizado de estroma corneal porcino.
2. Analizar a través de histología e inmunohistoquímica los estromas corneales desvitalizados.
3. Aislar queratocitos de córneas de cerdos jóvenes.
4. Analizar el fenotipo de queratocitos cultivados en monocapa.
5. Analizar la proliferación y viabilidad de queratocitos cultivados en estromas corneales desvitalizados.
6. Analizar la expresión de pro-colágeno I, queratocan y lumican en queratocitos sembrados en estromas corneales desvitalizados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención del andamio

Los andamios se obtuvieron por descelerización de córneas de cerdos jóvenes procedentes del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los cerdos se sacrificaron de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Se removieron ambos globos oculares y se colocaron en un frasco con amortiguador salino de fosfatos (PBS) suplementado con antibiótico (Ab) al 2%. En condiciones de esterilidad se lavaron 3 veces con solución estéril de PBS-Ab con el fin de eliminar los restos de fibrina, grasa y materiales extraños que pudieran contaminar la muestra. Se separó la córnea del resto del ojo (Figura 12) y se lavó nuevamente con PBS. Las córneas fueron incubadas en una solución de dispasa (Gibco™, USA) a una concentración de 2.4 unidades/ml durante tres horas a 37 °C para remover los epitelios anterior y posterior y obtener únicamente el estroma corneal. El estroma, ya sin epitelios, se colocó en un tubo Corning de 50mL con 30 ml de TritónX-100 al 2% durante 72 horas a 4° en agitación constante. Transcurrido el tiempo, los estromas se colocaron en un frasco limpio y estéril y se realizaron lavados con PBS hasta eliminar los residuos de detergente. Los estromas ya descelerizados se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su uso.

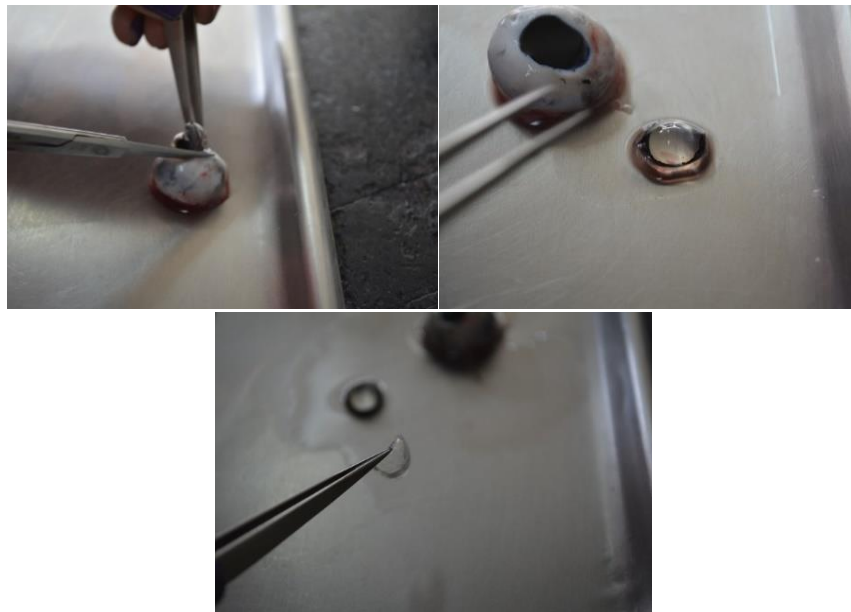


Figura 12. Extracción de la córnea porcina. Las córneas se obtuvieron de los globos oculares del cerdo por procedimiento de disección con material estéril.

Análisis histológico e inmunohistoquímico del andamio

Para el análisis histológico e inmunohistoquímico el estroma ya descelularizado se fijó con formaldehído al 3.7 % durante 12 horas a 4°C. Posteriormente se procesó mediante técnica histológica en parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 4 µm de espesor.

Tinción con HyE

Los cortes obtenidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE) para corroborar la descelularización. Estromas corneales sin tratamiento se procesaron de la misma forma para usarse como control. Las imágenes histológicas se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse 80i.

Tinción fluorescente con DAPI

Para comprobar la ausencia de células en el estroma, se realizó una tinción fluorescente con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Para ello, los cortes en blanco del estroma tratado con Tritón X-100 y del estroma sin tratamiento se desparafinaron durante 20 min a 60°C y se colocaron en dos baños de Xilol de 5 minutos cada uno. Se hidrataron en dos baños de alcohol absoluto de 3 minutos cada uno y se lavaron 30 veces en alcohol al 90%, 80% y 70%. Se colocaron en agua destilada por 30 segundos y se les realizó un lavado rápido con PBS. Posteriormente se les colocó Tritón X-100 al 0.1% por 10 min y se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos cada vez. Finalmente se incubaron con DAPI a 1.5 µg/ml durante 15 min a 37°C y se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i.

Inmunohistoquímica anti α -gal

Para corroborar la ausencia del epítipo α -gal se realizó una inmunohistoquímica de la siguiente manera: los cortes en blanco se desparafinaron durante 20 min a 60°C y colocaron en dos baños de Xilol durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se hidrataron en dos baños de alcohol absoluto por tres minutos cada uno y se realizaron 30 lavados rápidos en alcohol al 90%, 80% y 70%. Finalmente se colocaron en agua destilada por 30 segundos y se les realizó un lavado rápido con PBS. Se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0.3% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 3 minutos con PBS. Para bloquear el pegado inespecífico se incubó con PBS-ASB-Tween

(Albúmina sérica bovina 0.1%/tween 0.05%) durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de la incubación con el anticuerpo primario anti alfa-gal (Enzo Life Sciences, USA) a una concentración de 1:100 diluido en PBS-ASB-Tween, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las laminillas se lavaron con PBS tres veces durante tres minutos y se les colocó albúmina 0.1%/tween 0.05% por 10 minutos. Se colocó el anticuerpo secundario (Goat antimouse IgM biotinilado) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron con PBS 3 veces durante tres minutos, posteriormente se revelaron con diaminobenzidina y se contratiñeron con hematoxilina durante 1 minuto. Para la deshidratación de las muestras, se realizaron 30 lavados rápidos en alcohol al 70%, 80% y 90%, se colocaron en dos baños de alcohol absoluto de 3 minutos cada uno y dos baños de xilol de 5 minutos cada uno. Se les colocó resina y un cubreobjetos y se examinaron con microscopía de luz.

6.2 Aislamiento de células estromales corneales.

Los queratocitos se aislaron a partir de córneas de cerdos jóvenes procedentes del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los cerdos se sacrificaron de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Los globos oculares fueron removidos y colocados en un frasco con solución salina balanceada Hanks (HBSS) y antibiótico al 2%. En una campana de extracción, se lavaron tres veces con HBSS y antibiótico al 1% y se separó la córnea con material de disección estéril dejando un borde de esclera de aproximadamente 2 mm para preservar el limbo. Se retiró el exceso de esclera, el iris y la conjuntiva y las córneas se lavaron nuevamente con HBSS estéril. Se colocaron en una solución de dispasa II (2.4 unidades/ml) y se incubaron durante tres horas a 37 °C, seguido de la separación mecánica de ambos epitelios bajo el microscopio de disección con pinzas estériles delgadas. El tejido restante se cortó en piezas pequeñas de aproximadamente 2mm que se colocaron en 3ml de colagenasa I (Gibco™, USA) al 2% y se incubaron toda la noche a 37°C (Figura 13). La solución de digestión se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio y se sembraron en una caja Petri con medio DMEM- F12 (1:1; Biowest, Francia) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB; Biowest, Francia). Los queratocitos se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo (37°C, 5% CO₂) hasta alcanzar su confluencia con cambio de medio cada tres días.

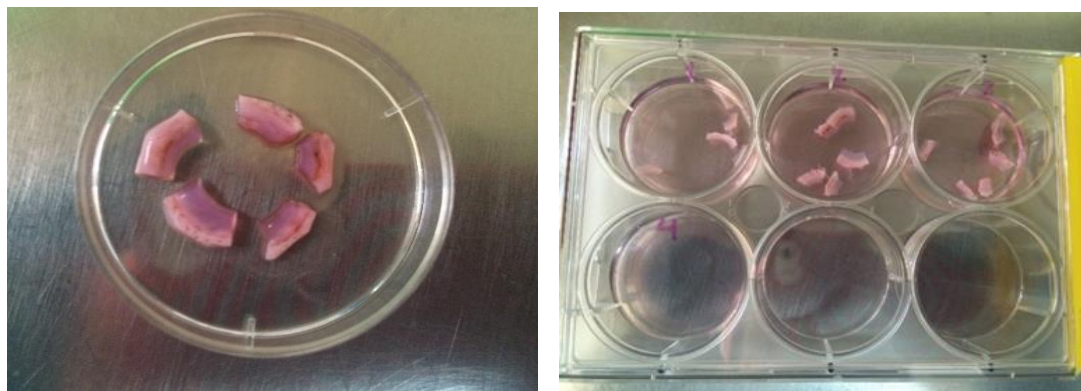


Figura 13. Aislamiento de queratocitos del estroma corneal. El estroma corneal sin epitelios se cortó en piezas pequeñas que se colocaron en colagenasa para digerir la matriz extracelular y obtener las células.

6.3 Cultivo de queratocitos en monocapa

Una vez que el cultivo de queratocitos alcanzó el 90 % de confluencia, se retiró el medio de cultivo de la caja Petri y se realizó un lavado con HBSS estéril. Se colocaron 5 ml de solución de tripsina 0.05% /EDTA 0.02% y se incubó a 37°C por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se colocaron 5 ml de medio DMEM-F12 con SFB para inactivar la tripsina. El volumen total (10 ml) se colocó en un tubo Corning de 15 ml y se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular. Se decantó el medio de cultivo y las células se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM-F12. Los queratocitos obtenidos se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pozos y se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂ con medio DMEM-F12 durante 1 y 10 días.

Análisis del fenotipo de los queratocitos en cultivo en monocapa

Para el análisis inmunohistoquímico, las células se fijaron con formol al 3.7 % durante 1 hora. Se lavaron tres veces con PBS. Se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 3 minutos con PBS. Se colocó albúmina 0.1%/tween 0.05% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró la albúmina y se colocaron, por separado, los anticuerpos primarios anti procolágeno-1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA), anti queratocan (1:100; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anti lumican (1:100; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Para el control negativo, no se colocó el anticuerpo primario y las células se incubaron con albúmina toda la noche a 4°C. Se realizaron tres

repeticiones por cada anticuerpo. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS tres veces durante tres minutos y se les colocó albúmina 0.1%/tween 0.05% durante 10 minutos. Se colocó el anticuerpo secundario para procolágeno-1 (Rabbit antigoat IgM) y para queratocan y lumican (Goat antirabbit acoplado a HRP) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de tres lavados de 3 minutos con PBS, se revelaron con diaminobenzidina y se contratiñeron con hematoxilina durante 1 minuto. Las células se deshidrataron con 30 lavados rápidos en alcohol al 70%, 80% y 90%, dos baños de alcohol absoluto de 3 minutos cada uno y dos baños de xilol de 5 minutos cada uno. Se les colocó resina y se montaron en un portaobjetos. Se observaron en el microscopio de luz y se obtuvieron fotografías con un microscopio Nikon Eclipse 80i.

6.4 Cultivo sobre el andamio desvitalizado.

Esterilización del andamio

Para su esterilización, los andamios obtenidos por descelularización de estromas porcinos se sumergieron en una solución de alcohol al 70% y se colocaron bajo luz UV durante 10 minutos por cada lado. Se colocaron en placas de 24 pozos con medio de cultivo DMEM-F12 y se incubaron durante 24 horas a 37°C para verificar su esterilidad y con el fin de que se impregnen con el medio de cultivo (Figura 14).

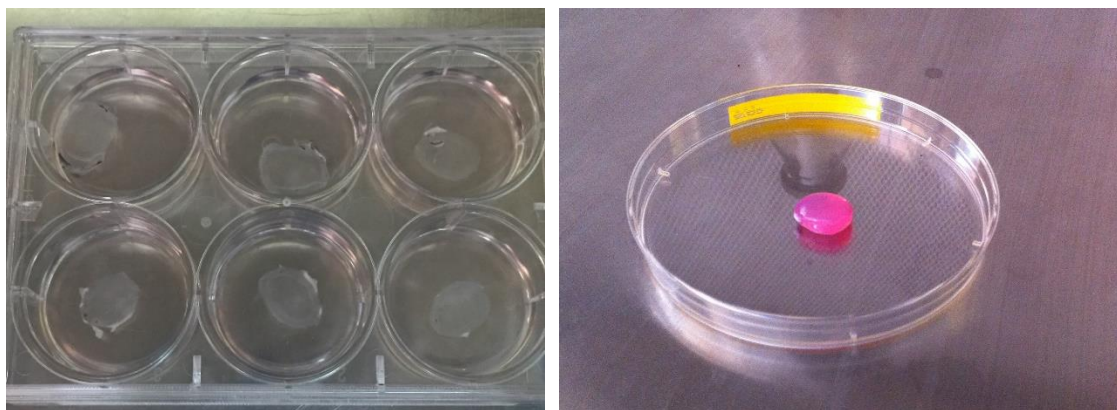


Figura 14. .Esterilización del andamio. Los andamios se colocaron en medio DMEM-F12 durante 24 horas a 37°C para comprobar su esterilidad y para que se impregnaran con el medio de cultivo.

Siembra de queratocitos en el andamio

Una vez que el cultivo de queratocitos alcanzó su confluencia, se lavó con PBS y se incubó en 5 ml de solución de tripsina 0.05%/EDTA 0.02% a 37°C durante 5 minutos a 37 °C. Ya disgregadas las células se agregaron 5ml de medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SBF para inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Las células se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió en 1 ml de medio DMEM-F12 y se realizó el conteo celular. Posteriormente los estromas ya esterilizados e impregnados con medio de cultivo se colocaron en placas nuevas de 24 pozos y cada andamio se sembró con 1×10^4 células que fueron inyectadas al interior del estroma con una jeringa de insulina con aguja 27G (Figura 15). A cada pozo se le agregó 2 ml de medio DMEM-F12 suplementado con 10% SFB. Los estromas sembrados con queratocitos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 10 días. El medio se reemplazó cada 2 días.

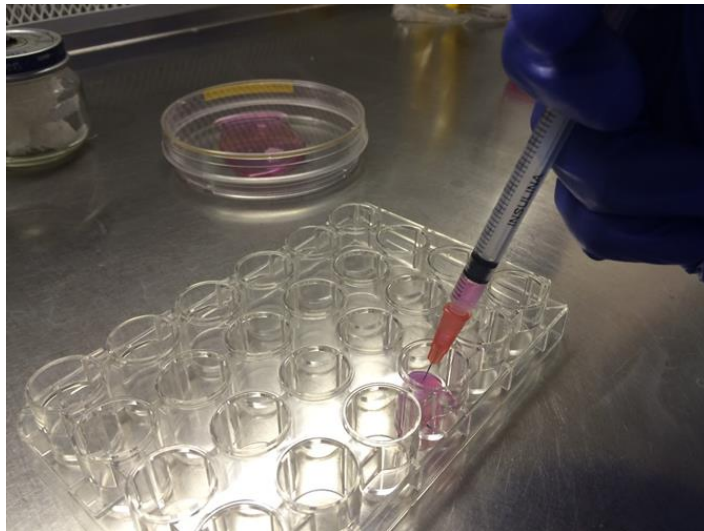


Figura 15. Siembra de los queratocitos en el estroma corneal descclularizado. Los andamios se colocaron en placas de 24 pozos y a cada uno se le inyectaron 1×10^4 células.

Evaluación de la proliferación y viabilidad celular

Inmunohistoquímica anti Ki-67

Para evaluar la proliferación de los queratocitos sembrados en el andamio, se realizó una inmunohistoquímica para evaluar la expresión de Ki-67. Los andamios ya fijados se colocaron en placas de 96 pozos y se les adicionó peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Se retiró el peróxido y se colocó TritónX-100 al 0.1% durante 10 minutos para permeabilizar la membrana celular. Se adicionó albúmina 0.1%/tween 0.05% durante 10 minutos. Se incubó el anticuerpo primario anti ki-67 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA) a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los andamios se lavaron 3 veces con PBS, se agregó albúmina 0.1%/tween 0.05% durante 10 minutos y se colocó el anticuerpo secundario (Goat antirabbit acoplado a HRP) con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C. Después de tres lavados con PBS se realizó el revelado con diaminobenzidina y la contratinción con hematoxilina.

Ensayo de viabilidad celular con calceína y homodímero de etidio

Los estromas corneales desvitalizados sembrados con queratocitos fueron colocados en placas de 96 pozos por triplicado. Se cambió el medio de cultivo (DMEM:F12 con FBS) por medio de ayuno (medio sin FBS más antibióticos). Inmediatamente se adicionaron ambos compuestos, calceína AM y homodímero de etidio, a un volumen de 1 μ M en cada pozo. Se incubaron los compuestos por 15 min en condiciones de cultivo. Posterior a la incubación, las células se lavaron con PBS con el objeto de retirar todo el fondo de la señal de ambos marcadores fluorescentes presentes aún en el medio. Posteriormente fueron analizadas por microscopía de fluorescencia (epifluorescencia), sin la necesidad de utilizar un método de fijación. Las lecturas se realizaron simultáneamente para observar tanto células vivas como células muertas.

Evaluación del fenotipo celular en el andamio

Para la evaluación del fenotipo de los queratocitos se evaluó la expresión de lumican, queratocan y procolágeno-1 mediante inmunohistoquímica. Para ello, los andamios ya fijados se colocaron en placas de 96 pozos. A cada pozo se le adicionó peróxido de hidrógeno para la inhibición de la peroxidasa endógena, seguido de tres lavados con PBS y del bloqueo

con albúmina 0.1%/tween 0.05%. En cada andamio por separado se colocó el anticuerpo primario para cada marcador en las siguientes diluciones: lumican 1:100, queratocan 1:100 y procolágeno 1:100. Se realizaron tres repeticiones por cada anticuerpo. Los estromas se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Después de que se les agregó nuevamente albúmina durante 10 minutos se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron con PBS tres veces, se revelaron con diaminobenzidina y se contratiñeron con verde luz. Se colocaron en un portaobjetos y se observaron en microscopía de luz.

En la figura 16 se proporciona una representación gráfica del método resumido.



Figura 16. Esquema metodológico. (a) Para la obtención del andamio, se obtuvieron córneas de cerdos jóvenes. Se removieron ambos epitelios y el estroma restante se sometió a un tratamiento con Tritón X-100 al 2% durante 72 horas a 4°C. El andamio obtenido se analizó con técnica histológica de rutina e inmunohistoquímica. (b) Posteriormente se aislaron queratocitos de estromas corneales porcinos mediante digestión por colagenasa. Las células obtenidas se sembraron y cultivaron en monocapa y se analizó el fenotipo por inmunohistoquímica para la expresión de queratocan, lumican y procolágeno 1. (c) Los queratocitos sembraron en el andamio previamente esterilizado y se realizó un análisis de la viabilidad y proliferación celular, así mismo se analizó en fenotipo de los queratocitos dentro del estroma corneal desvitalizado.

VII. RESULTADOS

7.1 Descelularización del estroma corneal

El uso de detergentes en protocolos de descelularización proporciona un método sencillo y eficaz, por lo que, para la obtención del andamio, estromas corneales se trataron mediante un método químico con Tritón X-100 al 2% durante 72 horas a 4 °C en agitación constante para permitir que el agente descelularizante permeara dentro del estroma.

Después del tratamiento, los estromas resultantes tuvieron una apariencia macroscópica similar a la córnea normal, sin embargo, mostraron una reducción en la transparencia debido a la excesiva hidratación de la matriz producido por la inmersión continua en las soluciones de desvitalización. (Figura 17).

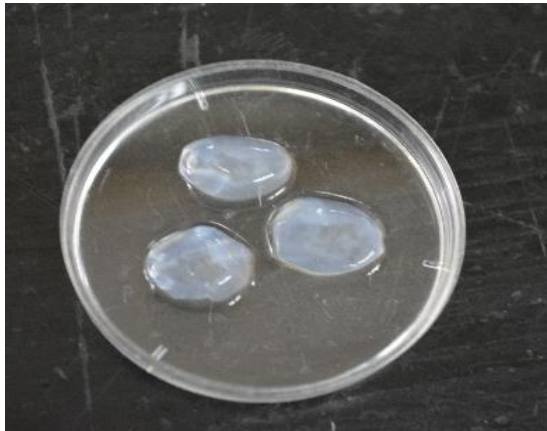


Figura 17. Vista macroscópica del estroma corneal porcino descelularizado. Para la obtención de los andamios, los estromas porcinos se colocaron en Tritón X al 2% durante 72 horas a 4° en agitación constante.

Para determinar la eficacia del método de descelularización y evaluar la integridad de la matriz extracelular después del tratamiento con el detergente Tritón X-100, los andamios obtenidos se fijaron e incluyeron en parafina para obtener cortes de 4 micras que se se tiñeron con HyE.

La observación por microscopía de luz de los cortes teñidos con HyE mostró que la descelularización del estroma corneal fue exitosa, ya que no se encontraron células remanentes entre las fibras de colágeno (Figura 18B). En contraste, el estroma corneal sin

tratamiento contenía una gran cantidad de células (Figura 18A). La tinción HyE también mostró que la separación de los epitelios anterior y posterior por digestión enzimática de la membrana basal con dispasa II fue exitosa, dado que no se encontraron restos de células epiteliales adheridas al estroma.

Así mismo, la evaluación histológica del andamio reveló que no hubo alteración de la matriz de colágeno, al no observarse fibras rotas ni desorganizadas, de manera similar a lo observado en el estroma sin tratamiento, lo que indicó que el agente de descelerización utilizado fue capaz de eliminar todos los elementos celulares del tejido y mantuvo la estructura y los componentes fibrilares de la MEC, que en la córnea es de vital importancia ya que cualquier alteración de la organización de las fibras de colágeno afecta la transparencia del tejido.

Para comprobar la ausencia de núcleos celulares en el estroma, el andamio obtenido se analizó por mediante tinción fluorescente con DAPI. No se detectó ningún residuo de ADN dentro del estroma descelerizado (Figura 19B), en contraste con el estroma sin tratamiento en el que se observaron múltiples núcleos (Figura 19A). La eliminación de todos los componentes celulares del estroma es de vital importancia ya que la descelerización insuficiente puede inducir una respuesta inflamatoria fuerte en el huésped.

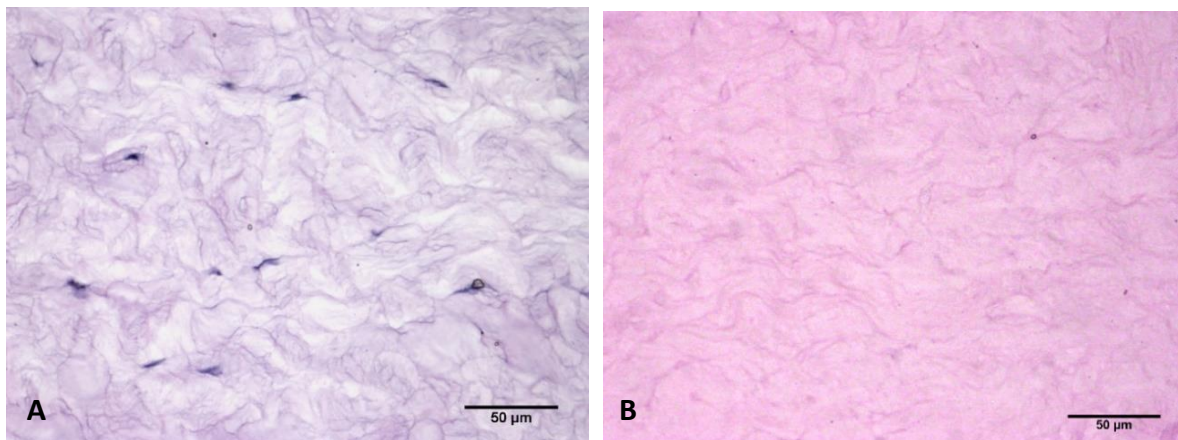


Figura 18. Estroma corneal porcino teñido con H y E. (A) Estroma corneal sin tratamiento en el que se observan células entre las fibras de colágeno. (B) Estroma corneal tratado con Tritón X-100 en el que se observan únicamente las fibras de colágeno sin células.

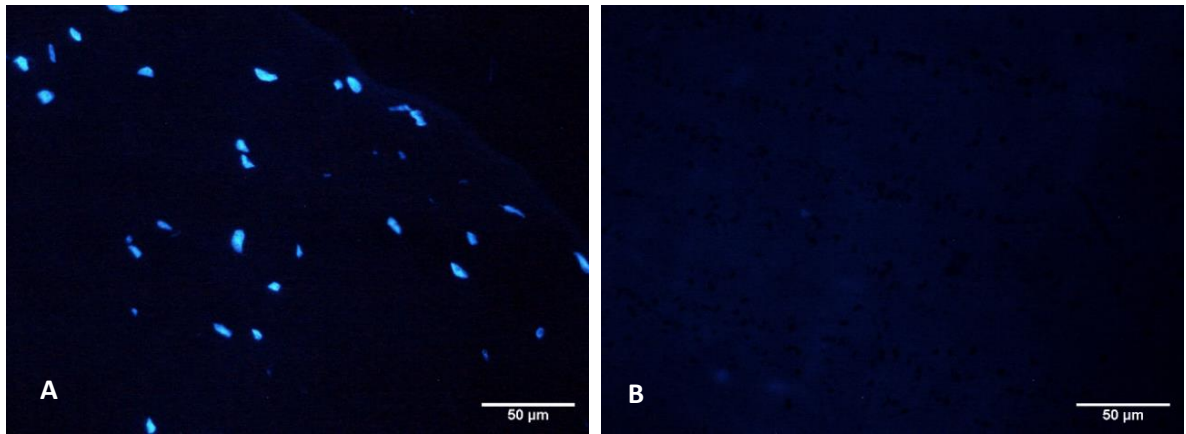


Figura 19. Inmunofluorescencia con DAPI.. (A) Estroma corneal sin tratamiento en el que se observan múltiples núcleos celulares (B) Estroma corneal tratado con Tritón X-100. No se observan restos de ADN dentro del andamio después del tratamiento de descelularización.

El principal responsable del rechazo inmunológico es el epítipo alfa gal, presente en tejidos de cerdo, por lo que se evaluó por inmunohistoquímica la presencia de esta molécula en el estroma desvitalizado. Se obtuvo que el estroma corneal desvitalizado fue negativo para el epítipo alfa-gal, lo que indicó que el detergente Tritón X-100 también fue capaz de remover epítipos inmunogénicos del estroma corneal (Figura 20B).

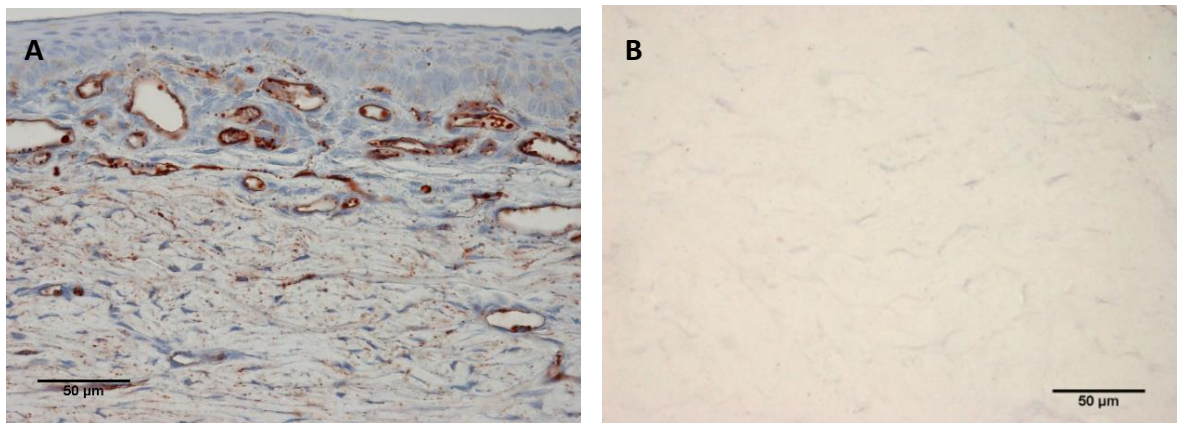


Figura 20. Inmunohistoquímica anti α -gal. (A) Córnea de cerdo sin tratamiento. Se observan células positivas a alfa-gal en el limbo esclerocorneal. (B) Estroma corneal desvitalizado.. No se observa marca positiva en el tejido estromal.

7.2 Aislamiento de queratocitos

Para el aislamiento de los queratocitos, el estroma corneal fue sometido a un proceso de digestión enzimática con colagenasa I para degradar la matriz extracelular y separar las células, que fueron sembradas y mantenidas en cultivo con medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los queratocitos aislados mediante este método fueron células viables que exhibieron una morfología dendrítica típica de estas células, con un cuerpo celular denso y múltiples proyecciones citoplasmáticas (Figura 21 A y B). Estas células fueron capaces de proliferar *in vitro*, alcanzando la confluencia después de 14 días en cultivo.

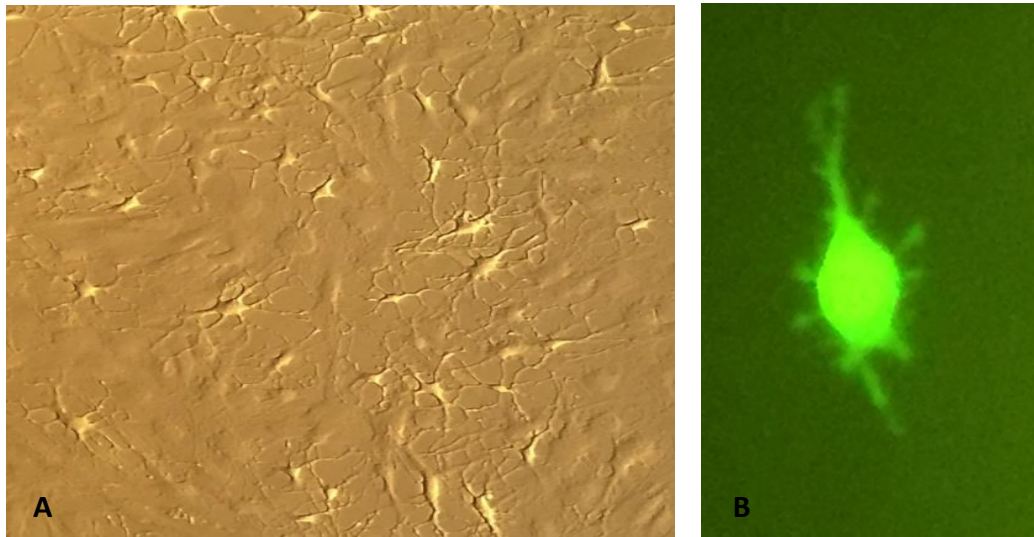


Figura 11. Queratocitos aislados de córneas porcinas. 100X (A) Cultivo de queratocitos en monocapa en el que se observan células con morfología dendrítica (B) Queratocito teñido con calceína en el que se pueden apreciar los procesos celulares.

7.3 Fenotipo de queratocitos en cultivo en monocapa

Con el fin evaluar el fenotipo celular *in vitro*, se realizó un análisis inmunohistoquímico para analizar la expresión de los marcadores específicos de queratocitos, queratocan y lumican, así como la expresión de procolágeno 1, después 1 y 10 días en cultivo.

La inmunohistoquímica anti-queratocan realizada al día 1 de cultivo mostró la expresión de este proteoglicano en los queratocitos en los que la marca positiva se observó en todo el citoplasma (Figura 22A). Después de 10 días en cultivo, las células aumentaron de tamaño y tuvieron una reducción de los procesos dendríticos, lo que podría indicar una posible transición hacia un fenotipo reparador; sin embargo, fueron positivas a la expresión de queratocan, lo que indica que aún mantienen el fenotipo de queratocito.

La inmunohistoquímica antilumican reveló algunas células positivas al día 1 en cultivo, no obstante, esta marca no fue tan evidente. Al día 10, el cultivo de queratocitos contenía células más grandes, con un aspecto poligonal, pero que expresaron lumican, siendo la marca positiva a este proteoglicano más notoria que en el día 1, con una localización perinuclear (Figura 22B), indicando que después de 10 días en presencia de SFB no se perdió completamente el fenotipo de queratocito, ya que mantuvieron la expresión de los dos marcadores típicos de dichas células.

Por otro lado, los queratocitos fueron negativos a la expresión de procolágeno-1, el principal componente del estroma, tanto al día 1 como al día 10 en cultivo. No se observó ninguna marca positiva, indicando que no hubo síntesis de esta proteína por las células (Figura 22 C), probablemente debido a que el medio de cultivo no contenía los factores necesarios para promover esta síntesis.

DÍA 1

DÍA 10

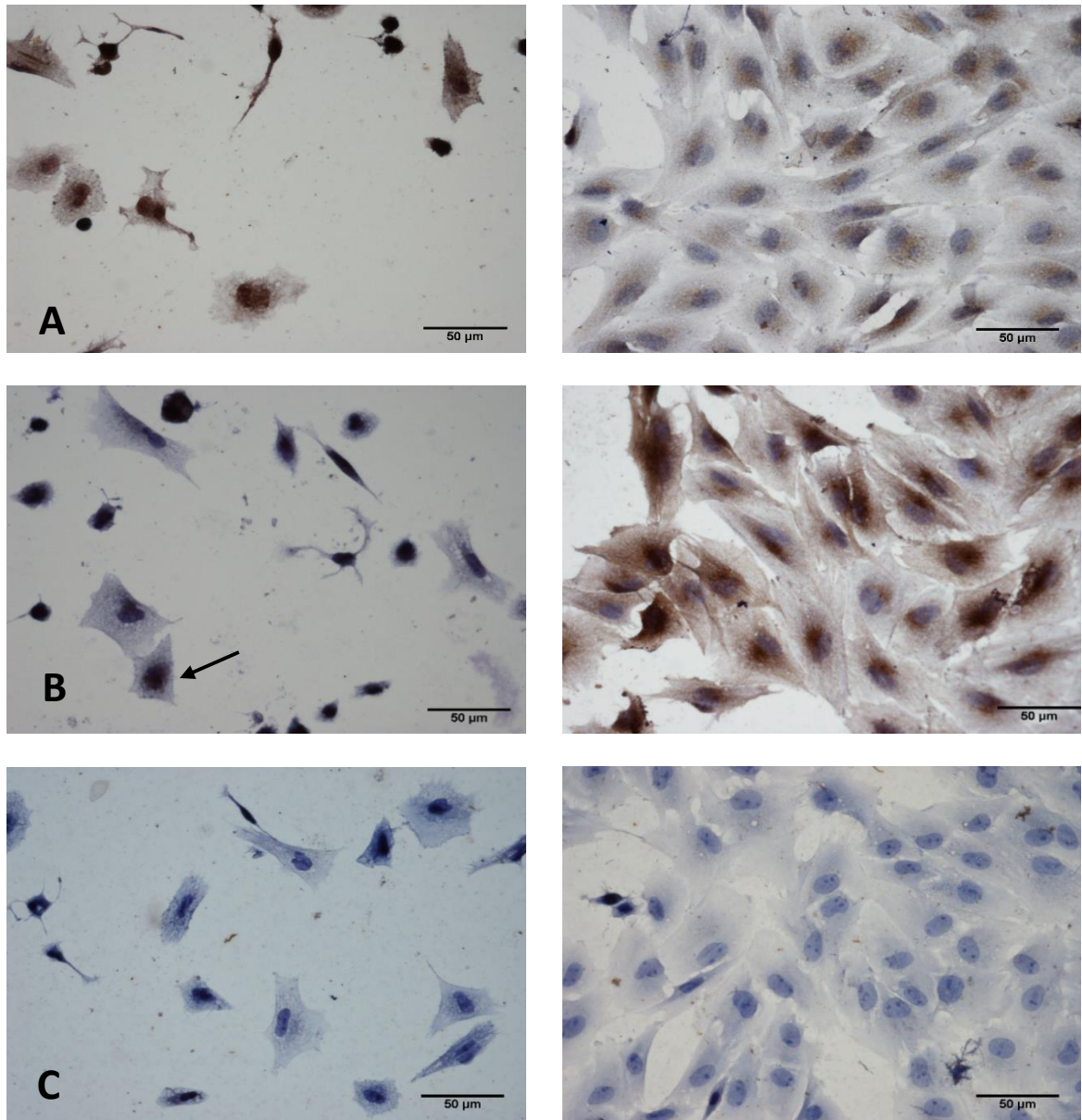


Figura 22. Tinción inmunohistoquímica en cultivos bidimensionales de células estromales corneales de origen porcino. Los cultivos fueron analizados a las 24 hrs y a los 10 días. (A) Tinción contra queratocan en queratocitos, (B) tinción contra lumican, (C) Tinción contra procolágeno 1. Note que los queratocitos expresan fuertemente keratocan y lumincan y se mantienen negativos para la expresión de colágeno.

7.4 Viabilidad y proliferación de queratocitos en el estroma descelularizado

Para la siembra de queratocitos en el andamio, se inyectaron 10^4 células al interior de cada andamio, que se mantuvo en cultivo durante 7 días con medio suplementado con SFB. La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con calceína y homodímero de etidio.

La observación de los andamios con microscopía de fluorescencia reveló que la siembra de las células en el estroma desvitalizado fue exitosa, al observar células viables en el andamio, mismas que se identifican por la tinción verde fluorescente (Figura 23A). Estos resultados indican que el andamio no tuvo efectos citotóxicos y que no quedaron restos de detergente que pudieran afectar la viabilidad celular. Se observaron únicamente algunas células muertas teñidas de rojo (Figura 23B). Se observó también que las células sembradas en el andamio estaban en diferentes planos, lo que podría indicar que se distribuyeron adecuadamente entre las laminillas de colágeno del estroma.

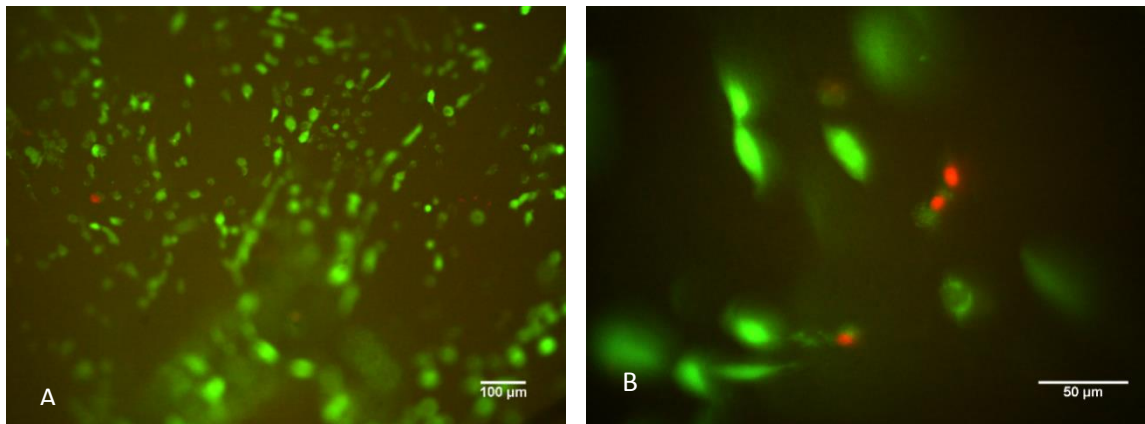


Figura 23. Viabilidad celular de los queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado. Se muestra el estroma corneal desvitalizado de cerdo sembrado con queratocitos teñido con calceína y heterodímero de etidio. Se observan células vivas teñidas de verde y algunas células muertas teñidas de rojo.

Para el análisis de la proliferación celular se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de Ki 67. Ki67 se sintetiza durante la fase G1 del ciclo celular y se degrada al completarse la fase M, por lo que se utiliza como marcador de proliferación celular.

Se obtuvo que los queratocitos sembrados en el andamio fueron negativos a la expresión de esta proteína (Figura 24B), lo que demuestra que no proliferaron dentro del andamio. Esto quiescentes y únicamente proliferan en respuesta a una lesión corneal.

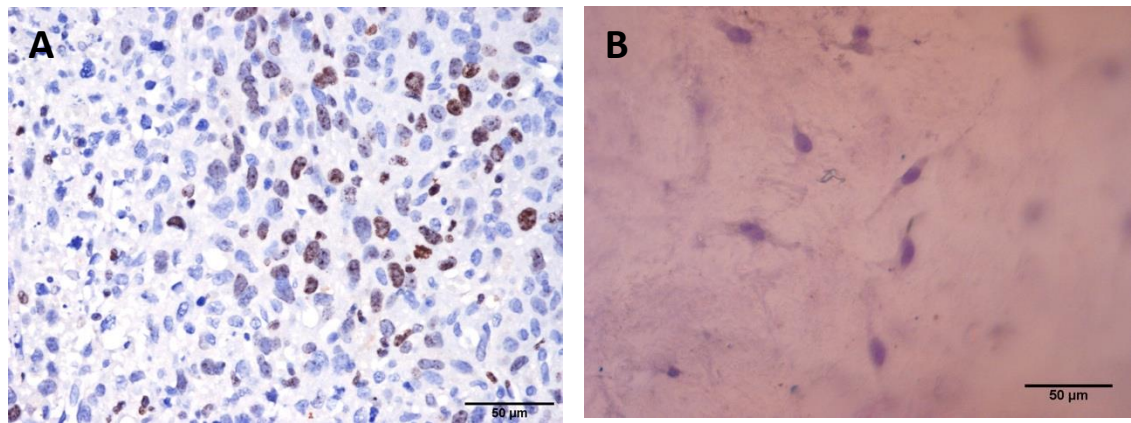


Figura 24. Análisis de la proliferación de queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado. (A) Control positivo de tejido tumoral. La coloración café indica las células positivas a ki-67 (B) Estroma desvitalizado sembrado con queratocitos. Se observan células alargadas al interior del estroma desvitalizado negativas a la expresión del marcador de proliferación Ki67, contrateñidas con hematoxilina.

7.5 Fenotipo de los queratocitos sembrados en el andamio desvitalizado

Los queratocitos son los principales responsables del mantenimiento del tejido estromal, mediante la secreción de moléculas de matriz extracelular, principalmente proteoglicanos de queratán sulfato, por ello, se evaluó el fenotipo mediante el análisis de la expresión de lumican, queratocan y procolágeno 1 por inmunohistoquímica.

Los queratocitos sembrados en el andamio mantuvieron la expresión de lumican. Se observaron células alargadas dentro del estroma con marca positiva presente en todo el citoplasma (Figura 25B). De igual manera, también fueron positivos a la expresión de queratocan, presentando una coloración café correspondiente a la presencia de este proteoglicano en la célula. Las células se encontraban dispuestas en diferentes planos del estroma corneal (Figura 26B).

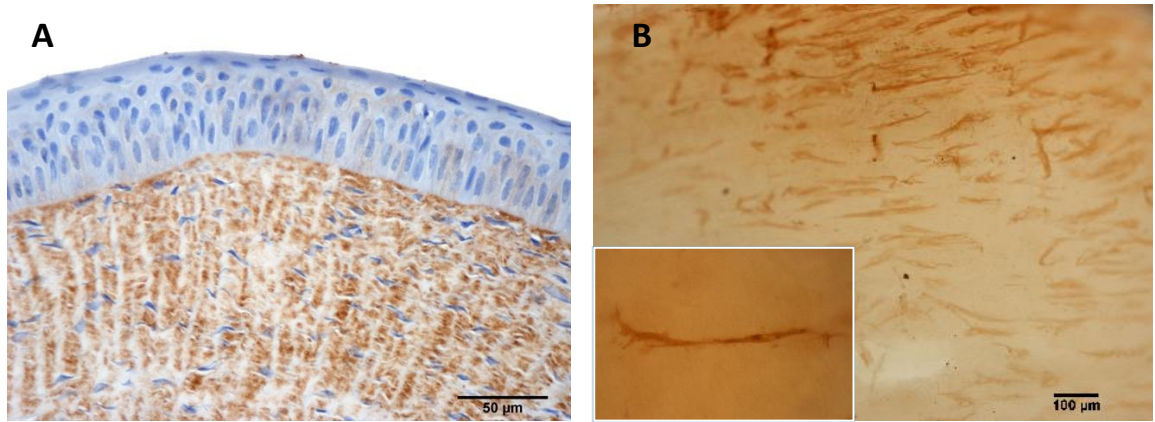


Figura 25. Tinción de inmunohistoquímica dirigida contra lumican. (A) Córnea normal de cerdo. (B). Estroma desvitalizado y sembrado con queratocitos. Se observan células alargadas positivas a la expresión de lumican. En el recuadro se muestra un acercamiento de los queratocitos (400X).

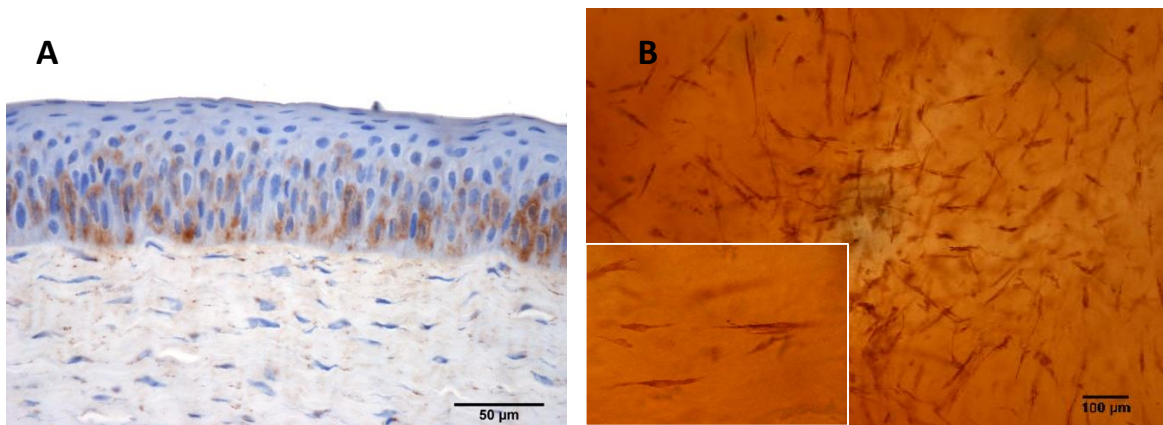


Figura 26. Inmunohistoquímica dirigida contra queratocan. (A) Córnea normal de cerdo. (B). Estroma desvitalizado sembrado con queratocitos. En el recuadro se muestra el acercamiento de un queratocito (400X).

El colágeno tipo 1 en conjunto con el colágeno V son los principales componentes de la matriz fibrilar del estroma corneal, en este proyecto evaluamos la expresión de procolágeno tipo I producido por los queratocitos. La inmunohistoquímica anti procolágeno 1 reveló células negativas (Figura 27B).

El queratocan y el lumican son los principales proteoglicanos de queratán sulfato en el estroma corneal y tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la transparencia

corneal, por lo que es importante que se mantenga la expresión de estos marcadores en las células sembradas dentro del estroma desvitalizado. La pérdida de estos marcadores indica una transición al fenotipo de “queratocito activado”, mismo que es perjudicial para el mantenimiento de la transparencia corneal ya que secreta una matriz extracelular que carece de la organización regular del estroma. Los resultados indican que el andamio desvitalizado permite retener el fenotipo de queratocito en las células aisladas, ya que el perfil de expresión de las proteínas evaluadas corresponde al observado *in vivo*, donde los queratocitos expresan los proteoglicanos característicos del estroma corneal, lumican y queratocan y son relativamente inactivos, produciendo un recambio muy lento de colágeno.

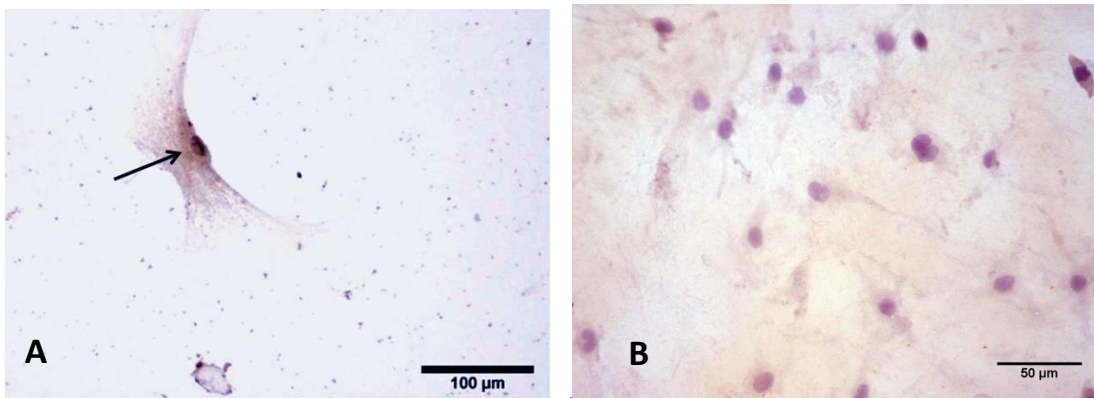


Figura 27. Inmunohistoquímica anti procolágeno-1. (A) Fibroblasto positivo a procolágeno 1. (B) Estroma desvitalizado sembrado con queratocitos. Se observan células negativas a la expresión de procolágeno 1 contrateñidas con hematoxilina.

VIII. DISCUSIÓN

Obtención del andamio

Uno de los principales desafíos en la ingeniería de tejidos en córnea es el desarrollo de un equivalente estromal que imite la ultraestructura del tejido nativo. Normalmente, el estroma se compone de laminillas de colágeno dispuestas ortogonalmente. Dentro de cada laminilla, las fibras de colágeno tienen un diámetro y espaciado interfibrilar regular. Hasta ahora, no se han desarrollado andamios sintéticos que puedan imitar la estructura del estroma, en consecuencia, existe un interés creciente en la utilización de la matriz extracelular nativa. Se ha reportado que las matrices acelulares derivadas de procesos de descelularización aplicados a córneas animales tienen un gran potencial como andamios para la ingeniería de tejidos (Fu *et al.*, 2010). El andamio proporciona señales estructurales, bioquímicas y biomecánicas para guiar y regular el comportamiento celular. Los andamios desvitalizados se pueden generar a través de una gran variedad de métodos de descelularización (Gilpin y Yang, 2017).

El método de elección para la obtención del estroma desvitalizado de cerdo fue el tratamiento con Tritón X-100 debido a que de todos los métodos de descelularización disponibles, aquellos basados en el uso de detergentes son probablemente los más simples y económicos (González *et al.*, 2015; Crapo *et al.*, 2011). Los detergentes son moléculas anfipáticas que contienen un grupo polar (cabeza) al final de una larga cadena hidrofóbica de carbono (cola), lo que les confiere propiedades únicas en el agua. Su grupo polar forma enlaces de hidrógeno con las moléculas del agua, mientras que las cadenas de hidrocarburo se agregan debido a interacciones hidrofóbicas. Estas propiedades permiten que los detergentes puedan solubilizar compuestos hidrofóbicos (Bhairi, 2007).

La disolución de membranas mediante detergentes ocurre en diferentes etapas. A bajas concentraciones, los detergentes se unen a la membrana por partición en la bicapa lipídica y hay una mínima perturbación de la misma. A concentraciones más altas, cuando las bicapas están saturadas con detergentes, las membranas se desintegran para formar micelas mixtas con las moléculas de detergente. En las etapas finales, la solubilización de las membranas conduce a la formación de micelas mixtas que consisten en lípidos, detergentes y proteínas. Con una mayor concentración de detergente, se alcanza un punto estable. Por encima de este punto, la solubilización no aumenta más (Bhairi, 2007).

El tritón X-100 es un detergente no iónico que contiene grupos hidrofílicos no cargados que consisten en restos de polioxietileno. En general, los detergentes no iónicos son más adecuados para romper las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína y no para romper interacciones proteína-proteína, por lo que se consideran no desnaturizantes (Bhairi, 2007). El tratamiento con tritón X-100 dio como resultado un estroma desvitalizado, como se observó en los cortes teñidos con HyE en los que no se encontraron células dentro del andamio. Se utilizó la inmunofluorescencia con DAPI como otro criterio para evaluar la eficacia de la descelularización, mediante esta técnica no se encontró material nuclear visible en el estroma desvitalizado. La definición de descelularización efectiva varía mucho entre los informes publicados, sin embargo, se ha definido como una falta de tinción positiva para núcleos intactos y antígenos celulares (Keane *et al.*, 2015), de modo que es posible afirmar que la descelularización del estroma corneal porcino fue exitosa ya que no hay núcleos visibles en la evaluación histológica a través de tinción con hematoxilina y eosina e inmunofluorescencia con DAPI. Es importante la comprobación de la remoción de los componentes celulares ya que la descelularización insuficiente puede inducir una respuesta inflamatoria fuerte. Se ha observado que un mayor grado de descelularización, medido por un contenido de ADN reducido, se asocia con una respuesta más favorable del tejido del huésped. Sin embargo, el contenido de ADN por sí solo no es el único factor determinante de la respuesta del huésped. El ADN residual y otros restos celulares como elementos mitocondriales, lípidos de membrana y otros constituyentes citoplasmáticos afectan la respuesta inmune del huésped y la remodelación del andamio. La eliminación de los componentes celulares (queratocitos, células dendríticas) por descelularización puede reducir la inmunogenicidad del injerto y prolongar su supervivencia (Keane *et al.*, 2015).

Una vez que las córneas animales se han sometido a un protocolo de descelularización, es muy importante verificar que se conserva la estructura histológica de los tejidos descelularizados. Idealmente, un agente de descelularización debería ser capaz de eliminar todos los elementos celulares del tejido y mantener la estructura y los componentes fibrilares y no fibrilares de la MEC. En el caso de la córnea, el principal componente fibrilar es el colágeno tipo I, que debe ser preservado y adecuadamente orientado para una función correcta de la córnea (González *et al.*, 2015). El análisis histológico del estroma desvitalizado permitió comprobar la conservación de la estructura de las fibras de colágeno. Resultados similares utilizando Tritón X-100 han sido reportados por otros autores.

Lee et al., 2014 descelularizaron córneas porcinas con Tritón X-100 al 4% por 2h a 37°C, en combinación con nitrógeno líquido. Al evaluar macroscópicamente el aspecto de las córneas descelularizadas, se pudo notar un engrosamiento y opacidd de la cornea por efecto del alto grado de hidratación, sin embargo, la transparencia y grososr se restableció posterior a un proceso de deshidratación con incubación en glicerol durante 2 h. El tratamiento con Tritón X-100 y N₂ eliminó por completo los componentes celulares y las estructuras de colágeno se mantuvieron en gran medida y no se distorsionaron. De igual modo, evaluaron la presencia de epítomos Gal en el estroma. Observaron que el tejido estromal de cerdo sin tratamiento tenía algunos queratocitos Gal positivos, sin embargo, después de la descelularización no permanecieron células gal-positivas.

Fu et al., (2010) utilizaron Tritón X-100 (1%) durante 48 hrs para la descelularización de córneas porcinas. La tinción con HyE no reveló núcleos celulares en el estroma corneal porcino descelularizado, y la arquitectura de la matriz estaba bien preservada en comparación con la de una córnea normal. La observación mediante microscopía electrónica de barrido, mostró que las laminillas de colágeno tenían una organización regular y numerosos poros, pero no se encontraron células entre las laminillas, y los poros internos del estroma corneal estaban interconectados. Los autores también midieron la biocompatibilidad *in vivo* del estroma descelularizado en un modelo de conejo con un seguimiento de 3 meses. No observaron signos de rechazo y la matriz acelular se integró gradualmente a la córnea del conejo, lo que indicó una buena biocompatibilidad. Por lo que concluyeron que el estroma corneal descelularizado se puede utilizar como andamio para la ingeniería de tejidos.

Además de la eliminación de los componentes celulares, la reducción de la inmunogenicidad del andamio es uno de los requisitos más importantes de la descelularización. Si la inmunogenicidad del estroma no se reduce lo suficiente, puede causar rechazo *in vivo*, lo que llevaría a una falla funcional del andamio, por ello es de vital importancia analizar la presencia de moléculas inmunogénicas. Dichas moléculas incluyen los epítomos alfa-gal, que tienen el potencial de activar la respuesta inmune (Gilpin y Yang, 2017). A causa de esto, el andamio obtenido se analizó mediante inmunohistoquímica para detectar la presencia del epítomo α -gal y no se obtuvo marca postitiva para esta molécula dentro del andamio después del tratamiento con Tritón X-100.

En córneas porcinas, se ha reportado que existe inmunorreactividad al epítipo α -gal en algunos queratocitos en la parte más anterior del estroma, aunque la mayoría de los queratocitos no tienen expresión de este epítipo. La inmunorreactividad al epítipo α -gal no se encuentra en el epitelio corneal, el endotelio o la porción media y posterior de las córneas porcinas. En contraste, se existe intensa inmunorreactividad alrededor de los vasos subconjuntivales, en la región intercelular del epitelio limbal y conjuntival, y en la matriz extracelular en la esclerótica (Amano *et al.*, 2003).

Aislamiento de células del estroma corneal

Una vez que se ha evaluado que la descelularización fue exitosa, es necesario obtener las células que serán sembradas para la recelularización del andamio obtenido. En el presente estudio se aislaron queratocitos del estroma corneal mediante la digestión enzimática con colagenasa. Los epitelios se removieron mediante digestión con dispasa en lugar de realizar un raspado como se indica en otros procedimientos (Fu *et al.*, 2010), ya que esto podría inducir la apoptosis de los queratocitos. La digestión con colagenasa liberó células viables que fueron capaces de adherirse y proliferar *in vitro*. Estas fueron probablemente células que no estaban en la superficie de corte, sino más profundas en las piezas del estroma. Las células que no se adhirieron a la placa de cultivo fueron retiradas mediante un lavado con HBSS.

El procesamiento adecuado del tejido es crítico para la viabilidad de los queratocitos primarios. Cortar en fragmentos pequeños el estroma facilita la eficiencia de la digestión con colagenasa para liberar los queratocitos residentes. Este procedimiento se realiza preferiblemente mediante cortes verticales para minimizar los daños celulares. Como se muestra en diferentes estudios morfológicos del tejido estromal humano, los queratocitos con forma dendrítica se alinean en la dirección de las fibrillas de colágeno y forman una extensa red con numerosos procesos celulares difusos y filiformes que establecen contactos con procesos de queratocitos adyacentes. Esto plantea la vulnerabilidad de las células cuando se exponen a cortes tangenciales. Además, debe evitarse la sobredigestión con colagenasa para mantener la viabilidad celular y su buena capacidad de adhesión en cultivo en cultivo primario (Beales *et al.*, 1999).

Fenotipo de los queratocitos cultivados en monocapa

Los queratocitos son responsables del mantenimiento de la matriz extracelular transparente bien organizada de la córnea. En la córnea normal adulta, los queratocitos son relativamente inactivos. Sin embargo, cuando ocurre una lesión, los factores de crecimiento y las citocinas, como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el TGF- β que son producidos por las células epiteliales corneales, las células inflamatorias y se encuentran también en la película lagrimal, activan a los queratocitos, que se diferencian en fibroblastos y miofibroblastos. Esta diferenciación incluye no sólo cambios morfológicos, sino también la expresión de componentes de MEC que no están presentes en la córnea normal (colágeno tipo III y metaloproteinasas de matriz extracelular). Los cambios también incluyen pérdida de la expresión de ciertos componentes normales del estroma (proteoglicanos de queratán sulfato). Los queratocitos activados parecen ser responsables de la cicatrización de la herida y la eventual pérdida de la transparencia corneal, al secretar una matriz extracelular desorganizada (Lee *et al.*, 2014).

Las células extraídas del estroma corneal se han cultivado previamente en varias condiciones diferentes, con la intención de conservar el fenotipo de queratocito. Tradicionalmente, los queratocitos se han cultivado en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (Sidney *et al.*, 2015). Sin embargo, la expansión *in vitro* de queratocitos cultivados en medio de cultivo suplementado con SFB se ha considerado similar a la activación de queratocitos *in situ* después de una lesión corneal, lo que ocasiona la diferenciación a fibroblastos corneales, que se caracterizan por una morfología fusiforme y marcadores proteicos tales como α -SMA, junto con la pérdida de marcadores de queratocitos. Los fibroblastos corneales exhiben un fenotipo de cicatrización de heridas y secretan una matriz extracelular desorganizada que se encuentra típicamente en las cicatrices corneales (Zhang *et al.*, 2016; Lakshman *et al.*, 2010).

Algunos investigadores han cultivado células en medios que contienen factores de crecimiento recombinantes como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en lugar de suero para obtener un fenotipo de queratocito. Sin embargo, la adición de factores de crecimiento recombinantes, tanto en la investigación como a nivel clínico, puede ser costosa. Por otro lado, los cultivos que contienen un menor porcentaje de suero, como 2% (vol / vol), retienen un fenotipo de queratocito más eficazmente, pero tienen tasas de proliferación mucho más bajas (Sidney *et al.*, 2015). En este estudio, los queratocitos se cultivaron en medio con SBF debido a que

ofrece diversas ventajas ya que proporciona una fuente de factores de unión y crecimiento, lo que permite la proliferación y la rápida expansión de las células. Este punto es de vital importancia para la ingeniería de tejidos, en la que se requiere la producción de células en un período de tiempo corto.

En la ingeniería de tejidos, es importante el mantenimiento del fenotipo para la construcción de un equivalente exitoso, por lo tanto, se evaluó la expresión de marcadores de queratocitos, lumican y queratocan, en las células aisladas del estroma corneal. Los proteoglicanos de queratán sulfato representan la clase principal de proteoglicanos en el estroma corneal. Desempeñan un papel importante en la estructura y fisiología de la córnea, particularmente en el mantenimiento de la transparencia corneal (Funderburgh *et al.*, 1996). Estudios iniciales de queratocitos mantenidos en cultivo celular informan que la síntesis *in vitro* de proteoglicanos de queratán sulfato característicos de la córnea normal es nula (Funderburgh *et al.*, 1996). En contraste, los queratocitos aislados en este estudio y cultivados en presencia de SFB fueron capaces de expresar queratocan y lumican, tanto al día 1 como al día 10 de cultivo. A pesar de que al día 10 de cultivo la mayoría de las células había perdido su característica forma dendrítica, indicando una posible diferenciación a fibroblastos corneales, aún conservaron la expresión de los marcadores del fenotipo de queratocitos. Beales *et al.*, reportaron que queratocitos cultivados en DMEM con 10% de SFB son capaces de sintetizar 17% de KS. Indican que el SBF actúa principalmente para estimular la síntesis de dermatán sulfato y tiene un efecto relativamente pequeño en la síntesis de KS.

Como se mencionó, cuando se busca construir un equivalente de tejido por medio de ingeniería de tejidos, la rápida producción de células es crucial, de modo que es posible expandir la población celular en medio suplementado con suero hasta alcanzar la población celular requerida y después revertir el fenotipo de “queratocito activado” al fenotipo de queratocitos quiescentes al cambiar el cultivo a un medio libre de suero.

Yam *et al.*, 2015, reportaron que es posible revertir el fenotipo de "queratocitos activados" cuando se elimina el suero del medio de cultivo. Cultivaron queratocitos con 0.5% de suero bovino fetal y expandieron la población de "queratocitos activados" que habían disminuido la expresión de marcadores de queratocitos. Estos "queratocitos activados" pudieron expandirse de seis a ocho pasajes, y recuperaron la morfología dendrítica y la expresión de los marcadores, incluyendo lumican y queratocan cuando se cambiaron a medio libre de suero, mismo que mantuvo a los queratocitos sin transformación a fibroblastos estromales.

Después de 14 días, la expresión de lumican se restauró en un 98%, y de queratocan en un 56%. Por lo tanto, las células del estroma corneal se pudieron propagar *ex vivo* como "queratocitos activados" transitorios. Esto podría proporcionar un número suficiente de queratocitos para la ingeniería de tejidos corneal.

In vivo, el estroma constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal y está compuesto de colágeno tipo I y V, siendo el colágeno tipo I el más abundante. Estos colágenos, junto con los proteoglicanos, aseguran la integridad y la resistencia a la tensión del estroma. El análisis de la expresión de procolágeno 1 reveló células negativas a esta proteína en el cultivo en monocapa de queratocitos. En estudios previos, se ha mostrado que la capacidad de los queratocitos para secretar MEC *in vitro* es limitada (Karamichos *et al.*, 2013). Una posible causa es que la formación de la triple hélice puede ocurrir solo si ciertos residuos de lisina y prolina en la molécula de colágeno se hidroxilan. Esta hidroxilación postraduccional se realiza por lisil o prolil hidroxilasas. Estas enzimas requieren ácido ascórbico como cofactor. La deficiencia de ascorbato en el cultivo celular puede afectar la síntesis de colágeno así como la tasa de secreción de esta proteína. La córnea y el segmento anterior del ojo contienen altos niveles de ascorbato, y se cree que funcionan como antioxidantes y protegen la córnea de las especies de oxígeno reactivas que resultan de la radiación UV (Musselmann *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible que al cultivar los queratocitos en un medio sin ácido ascórbico, éstos no fueron capaces de sintetizar colágeno.

Viabilidad y proliferación de los queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado de cerdo

Después de evaluar el fenotipo de las células aisladas, éstas se sembraron en el estroma desvitalizado y se realizó un análisis de la viabilidad para comprobar la biocompatibilidad del andamio. Se ha sugerido que la presencia de detergente residual dentro del andamio tiene efectos citotóxicos severos. Rieder *et al.* 2004, demostraron que los andamios descelularizados con SDS no pudieron ser recelularizados debido a los efectos tóxicos del detergente iónico. Los residuos de detergente pueden influir en la capacidad de la matriz extracelular para ser re-sembrada con células corneales. Además, se sugiere que las alteraciones en la estructura de la MEC a partir del tratamiento con detergentes pueden ocasionar una menor repoblación celular (Keane *et al.*, 2015). En este caso, el método de

descelularización y el detergente empleado no tuvieron efectos citotóxicos ni afectaron la estructura de la matriz extracelular de modo que las células sembradas en el estroma desvitalizado fueron viables. Además, no quedaron restos de detergente o restos celulares que pudieran afectar la viabilidad celular.

De igual forma, una vez que los queratocitos se sembraron en el andamio se evaluó la proliferación celular. Se obtuvo que las células fueron negativas a ki 67. Ki67 es una proteína nuclear de 395 kDa de función desconocida que se sintetiza durante la fase G1 del ciclo celular y se degrada al completarse la fase M, por lo que se ha usado ampliamente como marcador de proliferación celular (Zieske *et al.*, 2001). La falta de proliferación se puede relacionar con el comportamiento de los queratocitos *in vivo*. Estas células salen del ciclo celular durante la etapa embrionaria y permanecen así durante toda la vida adulta y son estimulados para proliferar únicamente en respuesta a una lesión corneal.

Durante la etapa embrionaria, la mayoría de las células del estroma corneal salen del ciclo celular, permanecen en G₀ y se vuelven inactivas. Algunas células del estroma continúan proliferando durante el período postnatal, pero esto cesa en los días 12 a 14 después del nacimiento (Weaving *et al.*, 2010).

Después de una lesión corneal, los queratocitos activados proliferan para repoblar el área de muerte celular dañada. Esto está mediado, al menos en parte, por factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), FGF, PDGF y TGF- β 1 (Zieske *et al.*, 2001). Se ha reportado que la expresión de Ki 67 en heridas corneales se limita al área subyacente al desbridamiento y no se modifica en la córnea periférica distal a la herida original. La gran mayoría de las células se someten a una sola ronda de proliferación celular, particularmente en el borde de la herida. Se plantea la hipótesis de que es la muerte de los queratocitos la que inicia la respuesta de curación de la herida. Es posible que los queratocitos apoptóticos liberen un factor que estimula la proliferación celular en las células adyacentes. Otros estudios también sugieren que el factor estimulante también podría derivarse de la disrupción de la membrana basal (Zieske *et al.*, 2001).

Es probable que no se observara proliferación dentro del andamio debido a que los queratocitos no tenían las señales adecuadas para entrar en el ciclo celular, señales similares a las observadas durante una lesión. Esto podría ser un indicador de que las células

sembradas en el estroma desvitalizado aún conservan parte de el fenotipo de queratocitos quiescentes.

Fenotipo de los queratocitos sembrados en el estroma desvitalizado de cerdo

Los queratocitos sembrados en el andamio mantuvieron la expresión de los marcadores típicos, queratocan y lumican, lo que indica que son células funcionales que podrían ser capaces de mantener la integridad del tejido mediante la producción de proteoglicanos corneales.

Otros estudios han realizado sistemas de cultivo 3-D y han demostrado la retención de la morfología y fenotipo celular, así como la restauración de fenotipos nativos que se han perdido o alterado en cultivos en monocapas. El cultivo de queratocitos en el estroma proporciona un entorno tridimensional, cuya disposición se parece más al tejido *in vivo* que los cultivos en monocapa. Se ha demostrado que un cultivo tridimensional puede promover o restablecer el fenotipo de queratocito normal, retrasando o evitando la transición fibroblástica que se observa en cultivos en monocapa, además de que permite el estudio de los queratocitos en un estado más cercano al nativo (Garagorri *et al.*, 2008).

Comprender y controlar tanto la expansión de una población celular, así como el fenotipo de queratocito quiescente son cruciales para el desarrollo de un equivalente corneal. Para que un equivalente corneal se considere exitoso, debe ser transparente. Es importante que las células mantengan el fenotipo dentro del andamio ya que se ha establecido que la α -SMA y, por lo tanto, el fenotipo de miofibroblastos da como resultado la dispersión de la luz y la opacidad corneal tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, los fenotipos “activados” pueden causar opacidades corneales, indicando la necesidad de la recuperación de los queratocitos quiescentes (Thompson *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que es posible promover la recuperación del fenotipo quiescente de una población de células subcultivadas y mantener la morfología dendrítica y la expresión de marcadores de queratocitos en entornos tridimensionales. Thompson *et al.*, 2014 investigaron los efectos del cultivo tridimensional en la expresión de marcadores de queratocitos. Reportaron que el cultivo 3D mostró recuperación de ALDH1, que es ampliamente aceptado como un marcador del fenotipo corneal nativo. La recuperación

ALDH1 indicó la capacidad del entorno 3D para inducir a los queratocitos subcultivados a exhibir un marcador distintivo de su fenotipo quiescente nativo. Este marcador se recuperó de una población subcultivada de células incluso en presencia continua de suero. Indicaron que es posible aislar células del estroma corneal, subcultivarlas para aumentar la población celular y luego tratarlas para recuperar parcialmente el fenotipo de queratocitos quiescentes. Este hallazgo es consistente con la plasticidad observada en la reversión libre de suero de células corneales que han sufrido transición a fibroblastos. La reversión celular de una población subcultivada es crucial para el éxito de un equivalente corneal y para hacer que las córneas diseñadas por medio de técnicas de ingeniería de tejidos estén ampliamente disponibles.

Además de la evaluación de la expresión de proteoglicanos de queratán sulfato, en este estudio también se evaluó la expresión de procolágeno 1 en los queratocitos sembrados dentro del estroma desvitalizado. Las células continuaron sin expresar procolágeno-1, del mismo modo que lo observado en el cultivo en monocapa. El estroma corneal sufre remodelación homeostática a una velocidad considerablemente más lenta que la dermis de la piel o la mayoría de los otros tejidos que contienen colágeno. En la piel, los colágenos dérmicos se degradan y se reemplazan a una velocidad lenta pero constante. En contraste, la rotación de la MEC en el estroma corneal es indetectable durante muchos meses. Además, la córnea es bastante resistente a cualquier evento que normalmente estimularía la remodelación en otros tejidos como la dermis. Por ejemplo, la córnea (como el resto del ojo) es un sitio inmunológicamente privilegiado. Esto significa que está relativamente protegido contra las respuestas inmunes a antígenos extraños o autógenos, con potencial para la destrucción de tejidos. La córnea es también notablemente resistente a estímulos, tales como lesiones mecánicas, que normalmente provocarían la activación de los queratocitos del estroma y la deposición y remodelación del tejido de reparación. La limitada respuesta fibrótica en el estroma después de incisiones quirúrgicas simples permite la reparación sin cicatrices y limita la contracción que podría alterar la forma corneal (Fini, 1999).

IX. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró el aislamiento de queratocitos a partir de córneas porcinas de manera exitosa debido a que los queratocitos aislados fueron positivos a los marcadores queratocan y lumican después de 10 días de cultivo y negativos para procolágeno I.

El tratamiento de descelularización de las córneas porcinas mantuvo la estructura de la colágeno que forma al estroma corneal, además de eliminarse el epítipo α -gal, responsable de rechazo inmunológico.

El andamio obtenido no ejerció ningún efecto citotóxico en los queratocitos, al contrario permitió mantener su fenotipo siendo positivos a queratocan y lumican, por otro lado, fueron negativos para el marcador de proliferación Ki-67 y procolágeno-1.

X. REFERENCIAS

- Alaminos, M., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Muñoz-Avila, J., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., Campos, A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8): 3311-7.
- Amano, S., Shimomura, N., Kaji, Y., Ishii, K., Yamagami, S., Araie, M. (2003). Antigenicity of porcine cornea as xenograft. *Curr Eye Res*, 26(6): 313-8.
- Amouzegar, A., Chauhan, S., Dana, R. (2016). Alloimmunity and Tolerance in Corneal Transplantation. *J Immunol*, 196(10): 3983-91.
- Beales, M., Funderburgh, J., Jester, J., Hassell, J. (1999). Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(8): 1658-63.
- Beuerman, R., Pedroza, L. (1996). Ultrastructure of the Human Cornea. *Microscopy Research and Technique*, 33: 320-335.
- Bhairi, S. (2007). *Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry*. San Diego, CA: Calbiochem-Novabiochem International.
- Bourges, J. (2017). Corneal dystrophies. *J Fr Ophtalmol*, 40(6): e177—e192.
- Bourne, W. (2003). Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*, 17: 912-918.
- Castillo, A., Pérez, Z., Escalona, E., Jareño, M., Díaz, M., López, S. (2014). Queratopatía bullosa poscirugía de catarata en el adulto mayor. *Rev Cubana Oftalmol*, 27(4): 587-97.
- CENATRA. (2016). *Boletín Estadístico – Informativo CENTRO NACIONAL DE TRASPLANTES (CENATRA)*. México.
- Chakravarti, S. (2006). Focus on Molecules: Keratocan (KERA). *Exp Eye Res.*, 82(2): 183-4.
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.*, 17, 467-479.
- Chen, S., Mienaltowski, M., Birk, D. (2015). Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res.*, 133: 69-80.
- Crapo, P., Gilbert, T., Badylak, S. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12): 3233-43.
- DelMonte, D., Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 37:588-598.
- Dua, H., Azuara-Blanco, A. (1999). Corneal allograft rejection: risk factors, diagnosis, prevention, and treatment. *Indian J Ophthalmol*, 47(1): 3-9.

- Duan, D., Klenkler, B., Sheardown, H. (2006). Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices*, 3(1): 59-72.
- Dyrlund, T., Poulsen, E., Scavenius, C., Nikolajsen, C., Thøgersen, I., Vorum, H., Enghild, J. (2012). Human Cornea Proteome: Identification and Quantitation of the Proteins of the Three Main Layers Including Epithelium, Stroma, and Endothelium. *J Proteome Res*, 11(8): 4231-4239.
- Eghrari, A., Riazuddin, S., Gottsch, J. (2015). Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134: 7-23.
- Ehlers, N., H. J. (2005). The Cornea: Epithelium and Stroma. *Advances in Organ Biology*, 10: 83-111.
- Estado actual de receptores, donación y trasplantes en México. Primer semestre 2017.* (3 de Septiembre de 2017). Obtenido de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/245082/1ersemestre2017.pdf>
- Fini, M. E. (1999). Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res*, 18(4): 529-51.
- Foster, J., Gouveia, R., Connon, C. (2015). Low-glucose enhances keratocyte-characteristic phenotype from corneal stromal cells in serum-free conditions. *Sci Rep*, 3(5): 1-16.
- Fu, Y., Fan, X., Chen, P., Shao, C., & Lu, W. (2010). Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. *Cells Tissues Organs*, 191(3): 193-202.
- Funderburgh, J. L. (2000). Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*, 10(10): 951-8.
- Funderburgh, J., Mann, M., Prakash, S., Conrad, G. (1996). Synthesis of Corneal Keratan Sulfate Proteoglycans by Bovine Keratocytes in Vitro. *J Biol Chem*, 271(49): 31431-31436.
- Galili, U. (2005). The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol.*, 83(6): 674-86.
- Galili, U. (2015). Human Anti-Gal and Anti-Non-Gal Immune Response to Porcine Tissue Implants. En S. Badylak, *Host Response to Biomaterials* (pág. 451). Estados Unidos : Elsevier Inc.
- Garagorri, N., Fermanian, S., Thibault, R., Ambrose, W., Schein, O., Chakravarti, S., Elisseff, J. (2008). Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomater*, 4(5): 1139-1147.
- Garg, P., Krishna, P., Stratis, A., Gopinathan, U. (2005). The value of corneal transplantation in reducing blindness. *Eye (Lond)*, 19(10): 1106-14.

- Ghezzi, C., Rnjak-Kovacina, J., Kaplan, D. (2015). Corneal tissue engineering: recent advances and future perspectives. *Tissue Eng Part B Rev*, 21(3): 278-87.
- Gilbert, T., Sellaro, T., Badylak, S. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27: 3675-3683.
- Gilpin, A., Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 1-13.
- González, M., Carriel, V., Rivera, M., Garzón, I., González, E., Medialdea, S., Campos, A. (2015). Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl Vis Sci Technol*, 4(2): 1-13.
- Gonzalez, M., De la Cruz, J., Ionescu, A., Campos, A., Del Mar, M., Alaminos, M. (2011). Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(1): 215-22.
- Griffith, M., Harkin, D. (2014). Recent advances in the design of artificial corneas. *Curr Opin Ophthalmol.*, 25(3): 240-7.
- Griffith, M., Fagerholm, P., Lagali, N., Latorre, M., Hackett, J., Sheardown, H. (2011). Regenerative Medicine in the Cornea. En A. Atala, R. Lanza, J. Thomson, R. Nerem, *Principles of Regenerative Medicine* (págs. 911-924). Canada. Elsevier.
- Hara, H., Cooper, D. (2012). Xenotransplantation-The future of corneal transplantation? *Cornea*, 30(4): 371-378.
- Hassell, J., Birk, D. (2010). The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res*, 91(3): 326-35.
- He, M., Callanan, A. (2013). Comparison of Methods for Whole-Organ Decellularization in Tissue Engineering of Bioartificial Organs. *Tissue Eng Part B Rev*, 19(3): 194-208.
- Hernández, J., Bautista, V., Chirinos, P., Navasa, A., Ramírez, A., Climent, A., Graue, E. (2013). Queratitis infecciosas: tendencias microbiológicas y sensibilidad a antibióticos. Segundo Reporte Anual del Grupo de Estudio de Microbiología Ocular del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana". *Rev Mex Oftalmol*, 87(2): 100-9.
- Huai, G., Qi, P., Yang, H., Wang, Y. (2016). Characteristics of α -Gal epitope, anti-Gal antibody, α 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review). *Int J Mol Med*, 37(1): 11-20.
- Johnson, M. (2013). Detergentes: Triton X-100, Tween-20, y más. *MATER METHODS*, 3(163).
- Kao, W., Liu, C.-Y. (2003). Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. *Glycoconj J.*, 19: 275-285.

- Kao, W., Funderburgh, J., Xia, Y., Liu, C.-Y., Conrad, G. (2006). Focus on Molecules: Lumican. *Exp Eye Res*, 82(1): 3-4.
- Karamichos, D., Rich, C., Zareian, R., Hutcheon, A., Ruberti, J., Trinkaus-Randall, V., Zieske, J. (2013). TGF- β 3 Stimulates Stromal Matrix Assembly by Human Corneal Keratocyte-Like Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(10): 6612–6619.
- Keane, T., Swinehart, I., Badylak, S. (2015). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, 84: 25-34.
- Lakshman, N., Kim, A., Petroll, W. (2010). Characterization of Corneal Keratocyte Morphology and Mechanical Activity within 3-D Collagen Matrices. *Exp Eye Res*, 90(2): 1-22.
- Langer, R., Vacanti, J. (1993). Tissue Engineering. *SCIENCE*, 260: 920-926.
- Lee, W., Miyagawa, Y., Long, C., Cooper, D., Hara, H. (2014). A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *Int J Ophthalmol*, 7(4): 587–593.
- Lynch, A. P., Ahearne, M. (2013). Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res*, 108: 42-7.
- Lynch, A., O'Sullivan, F., Ahearne, M. (2016). The effect of growth factor supplementation on corneal stromal cell phenotype in vitro using a serum-free media. *Exp Eye Res*, 151: 26-37.
- Machera, B., Galilic, U. (2008). The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1780(2): 75-88.
- Massoudi, D., Malecaze, F., Galiacy, S. D. (2015). Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders. *Cell Tissue Res*, 363(2): 337-49.
- Meek, K., Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*(49): 1-16.
- Michelacci, Y. (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*, 36(8): 1037-46.
- Michelacci, Y. M. (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*, 36(8): 1037-46.
- Musselmann, K., Kane, B., Alexandrou, B., Hassell, J. (2006). Stimulation of collagen synthesis by insulin and proteoglycan accumulation by ascorbate in bovine keratocytes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(12): 5260-6.
- Navaratnam, J., Utheim, T., Rajasekhar, V., Shahdadfar, A. (2015). Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *J Funct Biomater*, 6(3): 917–945.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. (3 de mayo de 2016). Obtenido de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- Oh, J., Kim, M., Lee, H., Ko, J., Wee, W., Lee, J. (2009). Processing porcine cornea for biomedical applications. *Tissue Eng Part C Methods*, 15(4): 635-45.
- Oyster, C. (1999). The Cornea and the Sclera. En C. Oyster, *The human eye. Structure and function* (págs. 325-378). Sinauer Associates, Inc. USA.
- Panda, A., Vanathi, M., Kumar, A., Dash, Y., Priya, S. (2007). Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol.*, 52(4): 375-96.
- Pérez, Z., Ulloa, S., Escalona, E., Castillo, A., Márquez, S. (2014). Caracterización clínica y epidemiológica del queratocono. *Rev Cubana Oftalmol*, 27(4): 598-609.
- Rana, D., Zreiqat, H., Benkirane-Jessel, N., Ramakrishna, S., Ramalingam, M. (2017). Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 11(4): 942-965.
- Rieder, E., Kasimir, M., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P., Weigel, G. (2004). Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127(2): 399-405.
- Ross, M., Pawlina, W. (2007). *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular* (Quinta edición ed.). Ed. médica panamericana. China.
- Ruberti, J., Roy, A., Roberts, C. (2011). Corneal biomechanics and biomaterials. *Annu Rev Biomed Eng.*, 13: 269-95.
- Ruberti, J., Roy, A., Roberts, C. (2011). Corneal structure and function. *Annu Rev Biomed Eng*, 13: 269-295.
- Ruberti, J., Zieske, J., Trinkaus-Randall, V. (2014). Corneal tissue replacement. En R. Lanza, R. Langer, & J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering* (págs. 1413–25). Elsevier Acad. Quinta ed. San Diego, CA.
- Secretaría de Salud (2011). *Queratoplastia penetrante*. México.
- Scott, S., Albert, S., Chakravarti, S. (2011). Sphere formation from corneal keratocytes and phenotype specific markers. *Exp Eye Res*, 93(6): 898–905.
- Shah, A, Brugnano, J., Sun, S., Vase, A., Orwin, E. (2008). The development of a tissue-engineered cornea: biomaterials and culture methods. *Pediatr Res.*, 63(5): 535-44.
- Sidney, L., Branch, M., Dua, H., Hopkinson, A. (2015). Effect of culture medium on propagation and phenotype of corneal stroma-derived stem cells. *Cytherapy*, 17(12): 1706-22.
- Smith, I., Ma, P. (2011). Biomimetic Scaffolds in Tissue Engineering. En N. Pallua, C. V. Suschek, *Tissue Engineering from Lab to Clinic*. Springer. Nueva York.

- Thomas, P., Geraldine, P. (2007). Infectious keratitis. *Curr Opin Infect Dis*, 20(2): 129-41.
- Thompson, R., Boraas, L., Sowder, M., Bechtel, M., Orwin, E. (2013). Three-Dimensional Cell Culture Environment Promotes Partial Recovery of the Native Corneal Keratocyte Phenotype from a Subcultured Population. *Tissue Eng Part A*, 19(13): 1564–1572.
- Verdiguel, K., Carrasco, A., Rangel, J. (2017). Categoría pronóstica de trasplante corneal en un centro de referencia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 54(6): 738-745.
- Wallang, B., Das, S. (2013). Keratoglobus. *Eye*, 27: 1004–1012.
- Wang, H., Wei, R., Zhao, S. (2013). Evaluation of corneal cell growth on tissue engineering materials as artificial cornea scaffolds. *Int J Ophthalmol*, 6(6): 873-8.
- Weaving, L., Mihelec, M., Storen, R., Sosic, D., Grigg, J., Tam, P., Jamieson, R. (2010). Twist2: role in corneal stromal keratocyte proliferation and corneal thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(11): 5561-70.
- Weiss, J., Møller, H., Aldave, A., Seitz, B., Bredrup, C., Kivelä, T., Lisch, W. (2015). IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. *Cornea*, 34(2): 117-59.
- West-Mays, J., Dwivedi, D. (2006). The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(10): 1625-31.
- Whitcher, J., Srinivasan, M., Upadhyay, M. (2001). Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.*, 79(3): 214-21.
- Williams, K., Coster, D. (2007). The immunobiology of corneal transplantation. *Transplantation*, 84(7): 806-13.
- Wilson, S., El Haj, A., Yang, Y. (2012). Control of Scar Tissue Formation in the Cornea: Strategies in Clinical and Corneal Tissue Engineering. *J Funct Biomater*, 3(3): 642–687.
- Xuan, M., Wang, S., Liu, X., He, Y., Li, Y., Zhang, Y. (2016). Proteins of the corneal stroma: importance in visual function. *Cell Tissue Res*, 364(1): 9-16.
- Yam, G., Yusoff, N., Kadaba, A., Tian, D., Myint, H., Beuerman, R., Mehta, J. (2015). Ex Vivo Propagation of Human Corneal Stromal "Activated Keratocytes" for Tissue Engineering. *Cell Transplant.*, 24(9): 1845-61.
- Zhang, J., Zhang, C., Du, L., Wu, X. (2016). Acellular porcine corneal matrix as a carrier scaffold for cultivating human corneal epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Int J Ophthalmol*, 9(1): 1-8.
- Zieske, J., Guimarães, S., Hutcheon, A. (2001). Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res.*, 72(1): 33-9.