

# RECONSTRUCCION *IN VITRO* DE EPITELIO CORNEAL EN MATRICES DE COLAGENO\*

por

Marcel Yecid Avila Castañeda\*\*, Jorge Ramiro Barrero\*\*\*, Gloria Romero de Pérez\*\*\*\*, Antonio Iglesias\*\*\*\*\*

## Resumen

Avila Castañeda, M. Y., Barrero, J. R., Romero de Pérez, G. & Iglesias, A.: Reconstrucción *In Vitro* de Epitelio Corneal en matrices de colágeno. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 22(84): 445-450. 1998. ISSN 0370-3908.

Las células epiteliales corneales humanas del limbo se cultivaron en lentes de colágeno. Las propiedades del epitelio reconstituido se examinaron mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Después de tres semanas de cultivo, las células presentaron uniones desmosómicas, uniones ocludens, microvellosidades en la superficie externa y formación de una membrana basal focal. Estos hallazgos son similares a los que se encuentran en la córnea normal, lo que sugiere que las células epiteliales cultivadas en matrices de colágeno podrían ser útiles para realizar trasplantes de epitelio corneal.

**Palabras claves:** Epitelio, cornea, colágeno.

## Abstract

Limbal human corneal epithelial cells cultured on collagen shields were analyzed using transmission electron microscopy. Corneal epithelial cells from the limbus were cultured on collagen shields. Ultrastructural properties of the reconstituted epithelium were examined by electron microscopy. After 3 weeks, corneal epithelial cells cultured on collagen shields were examined by electron microscopy. Junctional complexes, desmosomes, tight junction, gap junctions, as well as focal formation of basal lamina and microprojections in superficial cells was observed in a similar way that in vivo findings. Human corneal limbal epithelial cells cultured on collagen shields exhibit cellular and extracellular elements similar to the observed in vivo, suggesting that cultured cells on collagen carriers may serve for corneal epithelial transplantation.

**Key words:** Epithelium, cornea, collagen.

\* Financiado por Colciencias fondo N 2104-10-005-92, Alcon de Colombia y Centro de Microscopía Universidad Nacional

\*\* M.D Banco de Ojos Hospital San Juan de Dios (HSJD)

\*\*\* M D Director Médico Banco de Ojos HSJD Bogotá

\*\*\*\* Directora Centro de Microscopía Universidad Nacional

\*\*\*\*\* M.D Profesor Unidad de Reumatología HSJD Universidad Nacional.

## Introducción

La córnea por ser el tejido ocular más externo del globo ocular esta expuesto a sufrir multiples lesiones bien sea por cuerpos extraños, factores medio ambientales u otros más severos causados por quemaduras químicas, que pueden inducir pérdida visual importante debido fundamentalmente a alteraciones en la cicatrización de la superficie ocular ( neoformación de un epitelio que no tiene las características del epitelio normal). Como resultado hay una opacificación y neovascularización de la superficie ocular con los efectos de pérdida visual anteriormente mencionados (Thoft, 1977, 1988).

Las células madre del epitelio corneal se localizan en el limbo corneo-conjuntival y a partir de estas se produce la regeneración del epitelio corneal con sus características funcionales y bioquímicas propias (Shingleton, 1991). Cuando las células madre se lesionan el manejo de esta condición es especialmente difícil porque el epitelio no puede regenerarse. Dentro de las propuestas terapéuticas en las etapas iniciales se utilizan lubricantes, inhibidores de las colagenasas, lentes de contacto, factor de crecimiento epidermal (FCE), y en las fases posteriores se realiza trasplante de córnea, epiqueratoplastias, trasplantes heterólogos de conjuntiva, procedimientos que producen generalmente resultados desalentadores (Kenyon & Tseng, 1989).

El trasplante autólogo de conjuntiva se ha utilizado con resultados satisfactorios, pero en muchos casos no es posible emplear conjuntiva autóloga por daño bilateral. Estos casos son los que presentan peor pronóstico visual y requerirían procedimientos alternativos (Shermer et al., 1986)

Varios autores han sugerido la utilización de células epiteliales madre cultivadas para la regeneración de esta superficie corneal (Linderberg et al., 1993; Ohji et al., 1994; Garcher, 1990). Se han realizado diversas investigaciones y se ha estandarizado la técnica de aislamiento y propagación del epitelio, logrando además trasplantarlo en dermis de ratones (Linderberg et al., 1993). Otra alternativa utilizada es el empleo de matrices de colágeno como sustrato para la realización de dichos trasplantes (Geggel et al., 1991; He & McCulley, 1991); sin embargo no se han efectuado estudios tendientes a la evaluación de estos epitelios reconstituidos respecto a su morfología y a su comparación con el epitelio corneal in vivo. En este trabajo se evalúan los aspectos estructurales y ultraestructurales del epitelio corneal reconstruido *in vitro* y se propone la utilización de estos epitelios con fines terapéuticos, de una manera similar a la metodolo-

gía utilizada para reconstruir piel *in vitro* que se utiliza en trasplantes en pacientes con quemaduras severas de piel (Bell et al., 1981).

## Materiales y métodos

Se obtuvieron ojos humanos de donantes de edades entre los 25 y 45 años (total de 12 ojos) y con un tiempo no mayor de 12 horas entre el momento del deceso y la obtención del globo ocular. (Acorde con la reglamentación legal de donación y trasplantes vigente en el país).

Las células corneales se aislaron mediante técnicas de microcirugía descamando las hojas de epitelio del limbo corneo-escleral con un disector romo de córnea; una vez obtenidas estas hojas de células epiteliales se sometieron a un tratamiento con una mezcla de tripsina al 0.1% Sigma St Louis MO) y EDTA al 0.02% en PBS pH 7.4 y luego se incubaron a 37 ° C durante 1 hora con el fin para separar las células. Luego se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y se lavaron con medio de cultivo en tres ocasiones.

Las células se cultivaron a razón de  $2 \times 10^6$  células en pozos de cultivo de 35 mm (ICN Flow, Costa Mesa CA) en el medio Suplementado Hormonal que contiene medio mínimo esencial de Dulbecco, medio de Hams F12 en una proporción de 3:1 respectivamente, suplementándose con Suero Fetal Bovino al 10% (Gibco BRL Gaithersburg MD), Factor de crecimiento epidermal recombinante humano a 10 ng/ml (ICN Flow), Toxina de Colera a 100 ng/ml (ICN Flow), insulina a 5ng/ml (Sigma), mezcla antibiótica (Penicilina, estreptomycin, gentamicina y anfotericina B) a 20 mcg/ml (Sigma), hasta un estadio confluyente a una temperatura de 37 ° C, con humedad del 95% y CO<sub>2</sub> al 5%. luego las células se dispersaron con tripsina EDTA al 0.02%. Posteriormente se sembraron en una matriz de colágeno, Bio-cor 24 horas (Baush and Laumb Tampa FL) a una concentración de  $6 \times 10^4$  células por lente de colágeno.

El epitelio se cultivó durante 3 semanas, cambiando el medio de cultivo cada tercer día (Medio Suplementado Hormonal). La morfología de las células en el cultivo se registro mediante microfotografías en un microscopio de contraste de fase invertido.

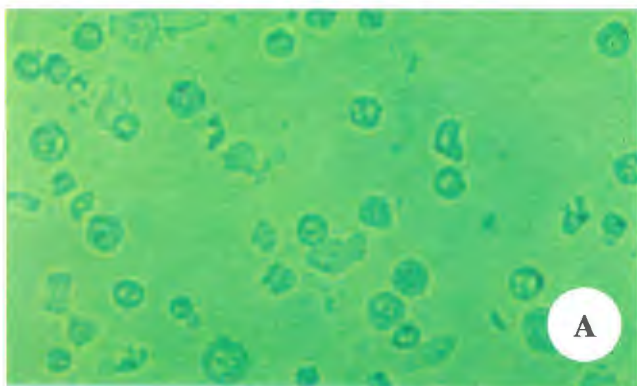
## Microscopía electrónica y óptica

El epitelio reconstituido en los lentes de colágeno se fijó durante 6 horas a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de Millonig 0.1 M pH 7.4. Después de lavar con la solución amortiguadora

las muestras se postfijaron en una solución de  $\text{OsO}_4$  durante 1 hora y luego se deshidrataron en gradientes de etanol. Posteriormente se embebieron en mezcla Epón-Araldita. Las secciones semifinas ( $\pm 2\mu$ ) se colorearon con Azul de toluidina para su observación al microscopio de luz. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio JEOL 100B. Las imágenes obtenidas fueron fotografiadas y digitalizadas mediante un procesador de imágenes Aldus Fotostar. Con el fin de resaltar detalles de ciertas estructuras se les asignó color .

## Resultados

En el análisis microscópico, el epitelio corneal reconstituido después de 3 semanas en cultivo presentó células de forma poligonal organizadas en 2 a 4 capas



**Figura 1.** Microscopía de contraste de fase de epitelio corneal cultivado en lentes de colágeno (A) Día 3 de cultivo: Se observan células con figuras de mitosis y múltiples espacios en el área de cultivo. (B) Día 21 de cultivo: Se observa el área de cultivo llena de células, en forma poligonal. Estas células se observan en capas bajo el microscopio de luz, antes de su análisis por M.E.T.

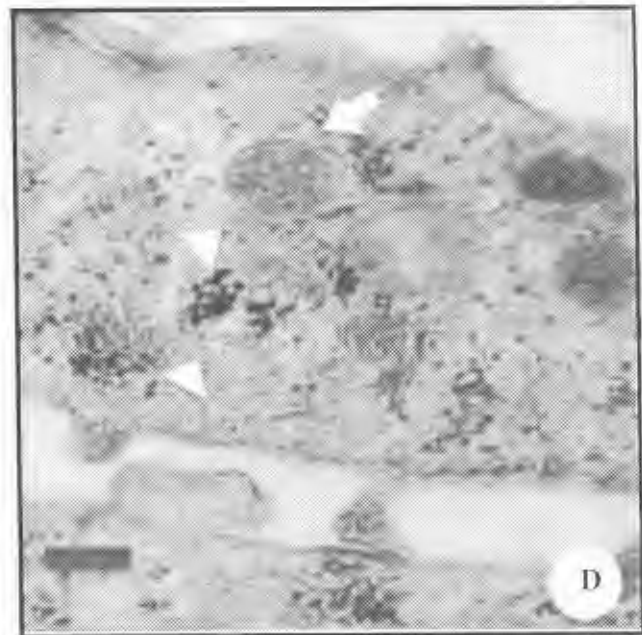
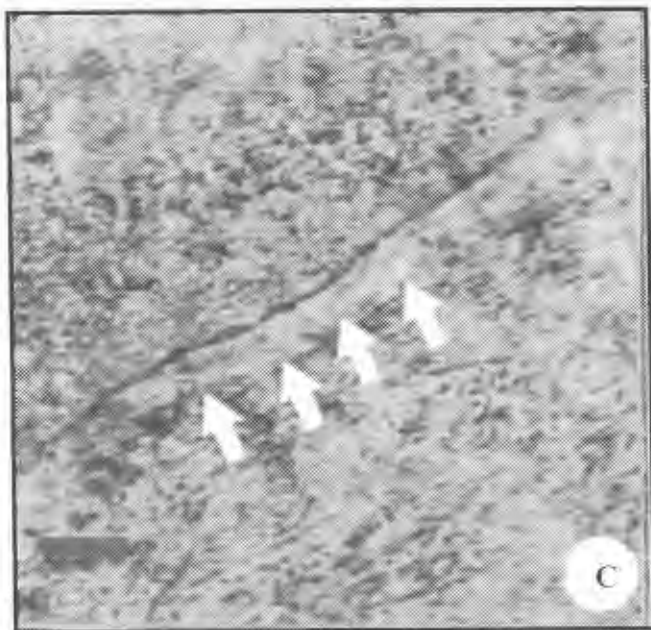
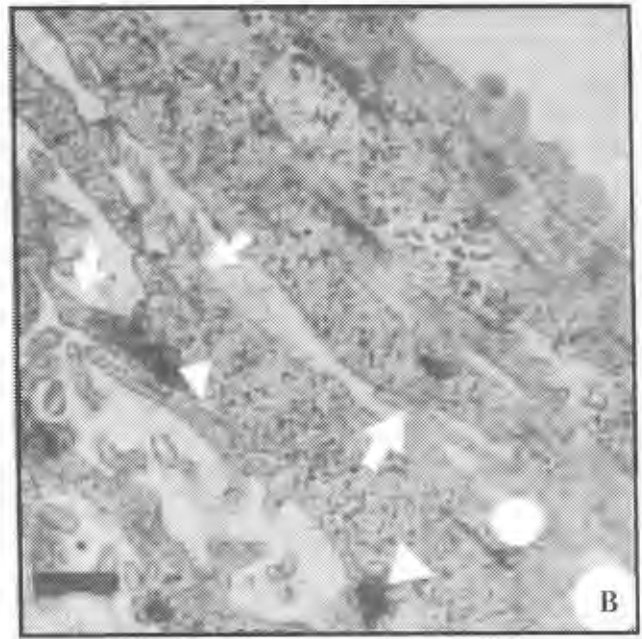
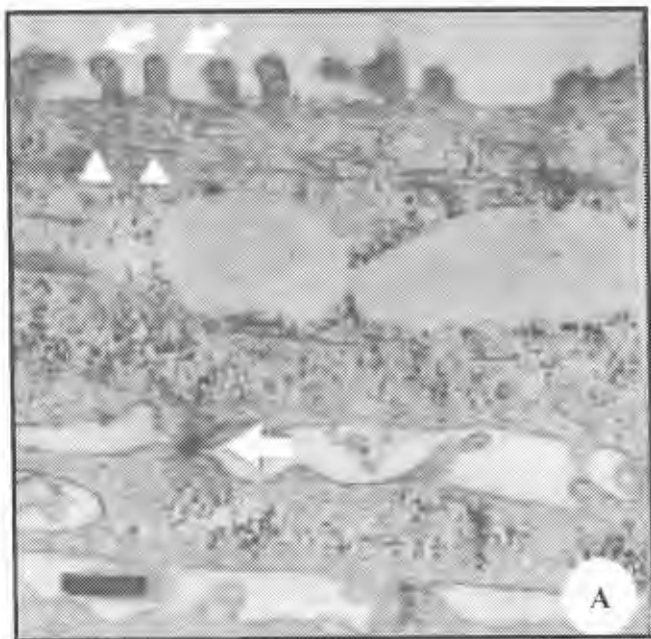
continuas ocupando la superficie de la matrix colágena (Fig 1.). Durante el tiempo del cultivo las células demostraron actividad mitótica, sin cambios degenerativos visibles. El examen de las electromicrografías mostró que las células epiteliales superficiales conservan las microvellosidades características con filamentos de actina, y un glicocáliz pobremente desarrollado. En esta capa se evidenciaron complejos de unión tipo zona ocluyente en el ápice celular, y desmosomas entre células contiguas, y con las células de la capa subyacentes (Fig 2 a). Las células basales presentan proyecciones laterales interdigitadas y unidas entre sí con uniones desmosómicas. (Fig 2 b). La digitalización de las imágenes permite apreciar con mayor detalle la estructura interna de las microvellosidades y los elementos constitutivos de los complejos de unión ( Fig 3.)

El citoplasma de las células en las diferentes capas presentó de una manera regular retículo endoplásmico rugoso (RER), tonofilamentos y pocas mitocondrias. Los gránulos de glucógeno se observaron especialmente abundantes en las dos capas celulares más basales (Fig 2.d). También fué evidente la presencia de lámina basal, aunque solo en puntos focales en la interfase epitelio-colágeno (Fig 2.c). En la matrix de colágeno se formaron pliegues ocasionales durante todo el tiempo de cultivo, pero se conservó siempre su integridad.

## Discusión

La utilización de células epiteliales cultivadas para trasplantes han sido propuestas para la reconstrucción de la superficie ocular (Linderberg et al., 1993; Ohji et al., 1994; Garcher, 1990). Sin embargo estos cultivos requieren de células nodriza que deben ser irradiadas durante los ciclos del cultivo celular. Las capas de epitelio corneal en estos cultivos epiteliales forman depósitos de componentes de membrana basal después de 2 semanas (Ohji et al., 1994).

En este estudio se observaron las primeras fases de desarrollo del epitelio corneal limbal sobre láminas de colágeno: el epitelio prolifera y se organiza en un número de capas que varía de dos a cuatro estratos. La capa de células más externa presenta microvellosidades sobre su superficie, de una manera similar al epitelio corneal *in vivo* (Nichols et al., 1983). Estas microvellosidades aumentan la superficie de contacto para mantener la película lagrimal y proteger el epitelio subyacente. Son propias de las células jóvenes. (Pfister & Rennen., 1977).

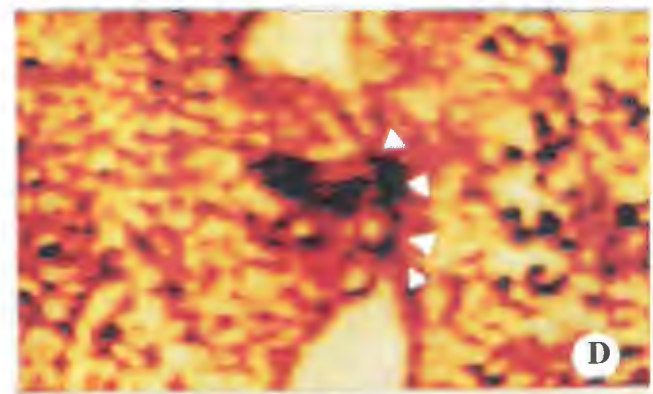
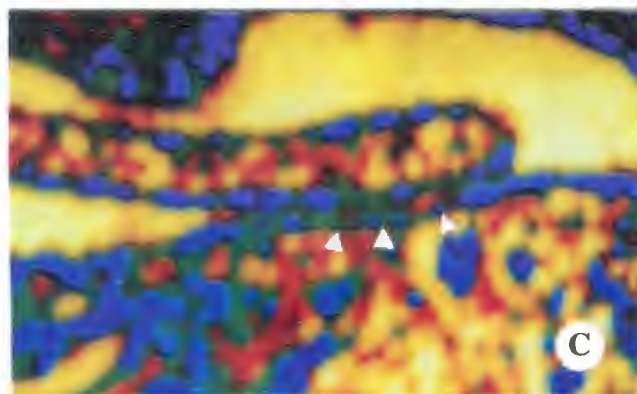
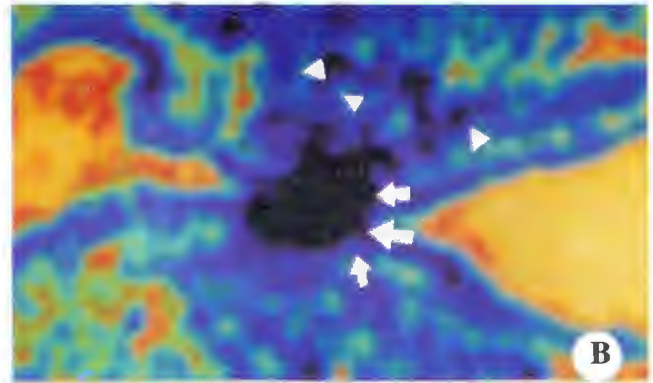
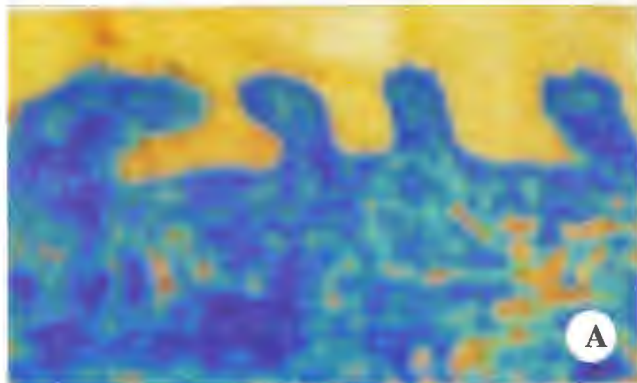


**Figura 2.** Ultraestructura del epitelio corneal cultivado en lentes de colágeno. **(A)** Microscopía electrónica de transmisión de las células epiteliales superficiales. Microvellosidades en la superficie (flechas pequeñas), las microvellosidades tienen núcleos de actina y los microfilamentos corren paralelos a la membrana celular (cabezas de flecha). Los desmosomas también se indican (flechas grandes). **(B)** M.E.T. Las células adyacentes tienen proyecciones laterales (flechas pequeñas) con uniones GAP (flechas grandes), uniones ocludens (asterisco) y desmosomas (cabezas de flecha). La barra representa una micra. **(C)** M.E.T. Una formación focal de membrana basal entre las células basales y el colágeno (flechas pequeñas). **(D)** M.E.T. Elementos intracelulares, mitocondria (flechas pequeña) y gránulos de glicógeno (cabezas de flecha). La barra representa media micra.

La observación de complejos de adhesión tipo ocludens en las células cultivadas confirman un alto grado de especialización de este epitelio y denotan la representación anatómica de la barrera epitelial, demostrada *in vivo* por varios autores (McLaughlin et al., 1985, Kikkawa, 1972). El epitelio reconstituido presentó también las uniones desmosómicas a nivel de las membranas laterales que caracterizan el epitelio normal. Estos complejos de unión proveen estabilidad mecánica a la tracción lateral y mantienen la unión intercelular (Kaufman et al., 1988). En forma ocasional, se observaron uniones comunicantes entre las células, cuya función consiste en permitir el paso de iones y pequeñas moléculas (aminoácidos, monosacáridos y segundos mensajeros)

entre las células a través de arreglos de proteínas de membrana denominadas conexones. Esto significa que el epitelio reconstituido se comporta como un tejido en el que las células presentan una activa interacción funcional. (Hall & Zampighi, 1993).

La presencia de gránulos de glucógeno en las capas basales del epitelio reconstituido *in vitro* se correlaciona *in vivo* con la presencia de estos gránulos en áreas correspondientes de la córnea normal, siendo estas inclusiones indicativas de diferenciación celular. Constituyen una reserva metabólica para ser utilizada en momentos de estrés celular (Kaufman et al., 1988).



**Figura 3.** Imágenes de M.E.T. de epitelio corneal reconstituido digitalizadas con asignación de tonos de color a los tonos de grises. (A) Superficie epitelial. Se aprecian con más detalle las microvellosidades con espacios entre ellas y los filamentos de actina paralelos a la superficie. (B) Desmosomas entre dos células cultivadas, se aprecian sus componentes. Núcleo de unión (flecha grande), placas de anclaje (flecha pequeña), fibrillas de anclaje (cabezas de flecha) (C) Uniones GAP, se aprecian zonas de intercambio (cabezas de flecha) entre las dos membranas (D) Uniones Ocludens, se observa fusión de las membranas celulares (cabezas de flecha).

Después de 3 semanas de cultivo fué evidente la formación de la lámina basal. Esta estructura es un elemento fundamental para la organización del epitelio y para su adherencia (Thoft, 1977). Como sucede en los epitelios, en la córnea la lámina basal es esencial para su mantenimiento, permanencia y diferenciación (McLaughlin et al., 1985), y en el éxito de los trasplantes del epitelio corneal (Ohji et al., 1994; Kikkawa 1972; Bell et al., 1981).

En conclusión se demuestra que las células epiteliales corneales humanas cultivadas en matrices de colágeno con la técnica descrita, pueden organizarse de una manera similar al epitelio corneal normal con los elementos celulares y extracelulares. Estos epitelios reconstituidos eventualmente podrían ser utilizados en trasplantes de epitelio corneal *in vivo*, aspecto que no se evaluó en este trabajo. Sería importante determinar la tolerancia inmunológica posterior al injerto de estos epitelios.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Doctor Eduardo Aicady por su generosa colaboración con los medios de cultivo, a la doctora Consuelo de Chávez por su constante apoyo, y a la bióloga Sonia Roa Trujillo por la ayuda técnica.

### Bibliografía

- Bell, E., H. P. Ehrlich, D. J. Buttle & T. Naketsuji. 1981. Living tissue formed in vitro and accepted as skin equivalent tissue in full thickness. *Science* 211: 1052-1054
- Garcher, C. 1990. Aspects and prospects of human corneal epithelium culture. *Bull. Soc. Fr. Ophthalmol.* 123-126.
- Geggel, H. S., J. Friend & R. A. Thoft. 1985. Collagen gel for ocular surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 901-905.

- Hall, J.E., G.A., Zampighi & R.M. Davis. 1993. Progress in cell research : gap junctions. Vol 3. Elsevier Press. New York.
- He, Y.G. & J. P. McCulley. 1991. Growing human corneal epithelium on collagen shield and subsequent transfer to denuded cornea in vitro. *Curr. Eye. Res.* 9:851-853.
- Kaufman, H. E., M. McDonald, B. Barron & S. Waltman. 1988. The Cornea . Churchill Livigstone pp., 8-12.
- Kenyon K.R., & S. C. G. Tseng. 1989. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96:709-723.
- Kikkawa Y. 1972. Normal corneal staining with fluorescein. *Exp. Eye Res.* 13: 18-24.
- Lindeberg K., M. Brown, H. Chavez, K. Kenyon & J. Rheinwald. 1993. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2672-2679.
- McLaughlin B.J., R. B. Cadwell & Y. Sasaky. 1985. Freeze fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res.* 4: 951-958.
- Nichols B., C.R. Dawson & B. Togni. 1983. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24: 570-574.
- Ohji M., N. Sundar Raj, J. Hasell & R. Thoft. 1994. Basement membrane syntesis by human corneal epithelial cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 479-485.
- Pfister R. & M. Rennen. 1977. The Histopatology of experimental dry spots and dellen in the rabbit cornea: a light microscopy and scanning and transmission electron microscopy study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 1025-1030.
- Shermer A., S. Galvin & T.T. Sun. 1986. Diferentiation related expression of a major 64 Kd corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal localitation of corneal stem cells. *J. Cell Biol.* 103: 49-52.
- Shingleton B. J., P.S. Hersh & K. R. Kenyon. 1991. Eye trauma. Mosby-Year Book:79-93.
- Thoft R A. 1977. Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol.* 16:14-20.
- Thoft R.A. & J. Friend. 1985. Biochemical trasformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26:425-423.