



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
FUNDACION CONDE DE VALENCIANA

**IDENTIFICACION DE COMPONENTE
ESTRUCTURAL DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA
QUE PROMUEVE LA PROLIFERACIÓN
CELULAR EPITELIAL
TESIS DE POSTGRADO**

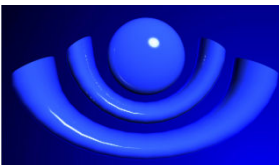
PARA OBTENER EL TITULO DE:

OFTALMOLOGO

PRESENTA

**DRA. EUGENIA FABIOLA PONCE DE LEÓN Y
SUÁREZ**

DIRECTOR DE TESIS:
DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA





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.

Dr. Enrique Graue Wiechers

Profesor titular del curso

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Claudia Murillo Correa

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra

Director de Tesis

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

DEDICATORIA

A MIS PADRES POR SU ESFUERZO Y DEDICACIÓN CONSTANTES, POR LA PREOCUPACIÓN, POR EL CONSENTIMIENTO, POR LOS BUENOS Y LOS MALOS MOMENTOS

A MIS HERMANOS POR ESTAR SIEMPRE AHÍ, APOYÁNDOME INCONDICIONALMENTE, BEMB GRACIAS POR TU CARIÑO, CARLOS GRACIAS POR LAS CONVERSACIONES

Y EN ESPECIAL A TI QUE NO ESTÁS, SE TE EXTRAÑA MUCHO...

***IDENTIFICACION DE FACTOR ESTRUCTURAL
DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA QUE
PROMUEVE LA PROLIFERACION EPITELIAL***

INDICE

| | |
|--------------------|--------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2 - 5 |
| METODOLOGÍA | 6 - 8 |
| RESULTADOS | 9 - 12 |
| CONCLUSIONES | 13 |
| BIBLIOGRAFIA | 14-15 |

RESUMEN:

La membrana amniótica, ha demostrado ser útil en el tratamiento de pacientes con deficiencia de células limbales de diversas etiologías. Los mecanismos de acción propuestos de la membrana amniótica son actuar como parche biológico, trasplante de membrana basal, promotor de epitelización, supresor de inflamación e inhibidor de angiogénesis. La membrana amniótica tiene componentes en común con la membrana basal de conjuntiva y córnea como laminina-1 y 5, fibronectina, ácido hialurónico y colágena tipo VII. El procesamiento de la membrana amniótica incluye criopreservación a -80°C , $+4^{\circ}\text{C}$. Se ha demostrado que después de 2 meses de criopreservación, al menos 50% de células amnióticas son viables y capaces de proliferar. Después de 18 meses no hay supervivencia celular. El objetivo de este estudio es demostrar el componente estructural de la membrana amniótica que promueve la proliferación de células epiteliales limbales.

INTRODUCCION:

La membrana amniótica es la capa interna de 3 capas que conforman las membranas fetales, se encuentra en contacto con líquido amniótico y la piel fetal. Al término de la gestación, la membrana amniótica varía en grosor de 0.02 mm a 0.5 mm de grosor, no contiene vasos sanguíneos, y consiste en cinco capas: epitelio, membrana basal, capa compacta, capa de fibroblastos y capa esponjosa. Figura 1.

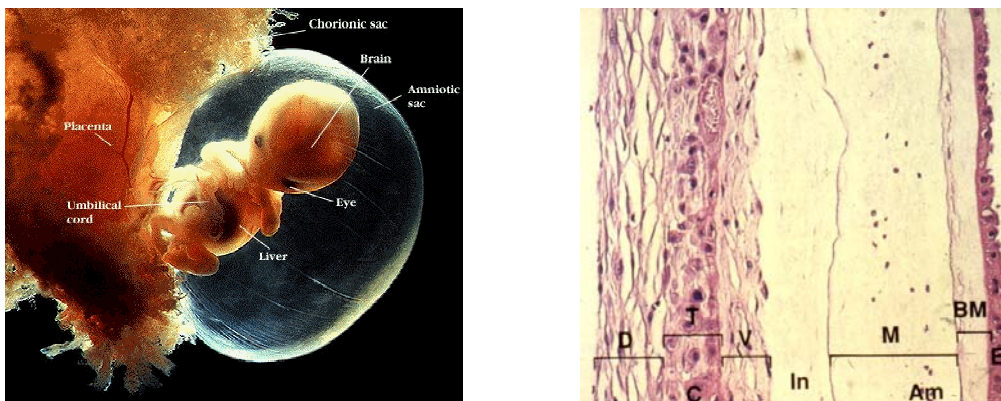


Figura 1. Donde se demuestra el desarrollo fetal como principal componente en la aportación de material para la formación de las membranas corioamnióticas. En la figura de la derecha se observan las estructuras histológicas de las membranas corioamnióticas.

La capa epitelial consiste en epitelio amniótico simple (células poligonales), la membrana basal es una capa delgada, compuesta de fibras reticulares. La capa compacta es densa, carente de células, consistente en una compleja malla reticular. La capa de fibroblastos es la mas gruesa y está compuesta por fibroblastos dispersos en una malla reticular menos densa. Y la capa esponjosa está formada por fibras reticulares onduladas cubiertas de mucina. Figura 1. (3) (donde se encuentra la referencia 1)

Las células madre epiteliales de la córnea, están situadas en el limbo esclerocorneal, esta área especializada tiene un microambiente que es crucial para funcionamiento de estas células madre.

Enfermedades que destruyen a estas células o su microambiente estromal, provocan deficiencia de células madres limbales (LSCD Limbal Stem Cell deficiency).¹ Histopatológicamente, LSCD se caracteriza por invasión corneal progresiva de células epiteliales conjuntivales, vascularización superficial, destrucción de la membrana basal e infiltración de células inflamatorias. (2)

La membrana amniótica, ha demostrado ser útil en el tratamiento de pacientes con LSCD de diversas etiologías, como pueden ser quemaduras térmicas o químicas, síndrome de Stevens Johnson, y penfigoide ocular cicatrizal; o defectos epiteliales persistentes como úlceras neurotróficas y perforaciones corneales; también reconstrucción conjuntival, cirugía de pterigión, y queratopatía bulosa sintomática.

Los mecanismos de acción propuestos de la membrana amniótica son:

- Parche biológico
- Transplante de membrana basal
- Promotor de epitelización
- Supresor de inflamación
- Inhibidor de angiogénesis (3)

Al usarse como parche para cubrir áreas inflamadas o expuestas secundarias a trauma o cirugía, tiene un efecto favorable al disminuir el dolor, lo cual parece ser un efecto simplemente mecánico(4).

Además provee una membrana basal que actúa como substrato para el crecimiento epitelial, por sus características similares a las de la membrana basal corneal (5).

Uno de los componentes de la membrana basal corneal es la laminina, sin embargo, existen varias isoformas de laminina en la membrana amniótica que no están presentes en la membrana basal de la córnea, las cuáles favorecen la rápida adhesión y propagación de células epiteliales corneales(6). La laminina-5 contenida en la membrana amniótica, se encuentra unida covalentemente a la laminina-6 y con otra isoforma laminina-7. La asociación entre estas lamininas permite una asociación estable de células epiteliales a la membrana basal.

Tseng postuló que la membrana amniótica, no sólo actúa como membrana basal, sino que también facilita la migración de células epiteliales, promueve su diferenciación y previene apoptosis(7).

Se ha encontrado una disminución de TGF-B con sus 3 isoformas, y su receptor II(3). Lo anterior podría explicar la razón por la que impide una respuesta exagerada de fibroblastos durante la cicatrización en patologías como perfigoide cicatrizal. Por lo tanto, el efecto antiproliferativo que tiene TGF-B sobre macrófagos, células endoteliales y linfocitos T y B está también disminuido. Sin embargo, se ha encontrado la presencia de mRNA para IL-1RA(antagonista de receptor para IL-1) e IL-10, los cuales son potentes inhibidores de la inflamación. 8

Todas las células epiteliales amnióticas, expresan Trombospondina-1, endostatina e inhibidores de metaloproteasas, que tienen efecto antiangiogénico(9).

Se ha demostrado que después de 2 meses de criopreservación, al menos 50% de células amnióticas son viables y capaces de proliferar. Después de 18 meses no hay supervivencia celular(10). Con lo que se sustenta que la viabilidad de los componentes celulares de la membrana amniótica, no son esenciales para su efectividad. De lo que podemos sugerir que la viabilidad celular no es indispensable para el funcionamiento de la membrana amniótica, se infiere que se puede prescindir del epitelio amniótico y las sustancias que secreta.

Por lo tanto, el promotor de epitelización, podría tener su origen en un componente estructural de la membrana amniótica por el que tiene afinidad el epitelio corneal.

Entre los componentes estructurales exclusivos de la membrana amniótica se encuentra la laminina, unida covalentemente a otras dos isoformas (6). El epitelio corneal y conjuntival tiene receptores para laminina, conocido como Galectina, considerado como la principal proteína no perteneciente al grupo de integrinas, que actúa como receptor para laminina celular(11).

La Galectina pertenece al grupo de las lectinas que son una clase de proteínas de adhesión que reconocen residuos de oligosacáridos específicos (mucinas) que se muestran sobre la superficie celular. Estas lectinas se enlazan principalmente a residuos de hidratos de carbono en las cadenas laterales de mucina(12). Se clasifican en cinco categorías: tipo C, tipo I, tipo P, galectinas y pentraxinas.

Funcionalmente, se piensa que las galectinas tienen un papel biológico crucial en el reconocimiento de ligandos de hidratos de carbono en compartimentos intra y extracelulares y glicoproteínas de la matriz extracelular, lo cual contribuye a interacciones célula-célula y célula-matriz, regulación de crecimiento celular y apoptosis(11).

La Galectina-3 es una proteína de 29-35 kDa, que es secretada y expresada por varios tipos celulares, especialmente monocitos, macrófagos, células cebadas, y células epiteliales, incluyendo al epitelio corneal. Es un mitógeno capaz de estimular la proliferación de fibroblastos, con estimulación paracrina, a través de interacción con glucoconjugados de la superficie celular. Los glucoconjugados representan un importante componente de la superficie celular y no hay datos al respecto de glucoligandos reactivos a galectina-3 en la superficie epitelial ocular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se desconoce el componente estructural específico de la membrana amniótica que promueve la proliferación de células epiteliales corneales. Aunque se ha usado ampliamente en cirugía ocular, únicamente se proponen teorías para determinar este mecanismo.

HIPÓTESIS:

Hipótesis alterna

Los componentes estructurales de la membrana amniótica son un factor promotor de la proliferación de células epiteliales corneales

Hipótesis nula

Los componentes estructurales de la membrana amniótica no tienen efecto sobre el crecimiento de las células epiteliales

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el componente estructural responsable de la proliferación de células epiteliales en el uso de membrana amniótica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar proliferación celular en presencia de estroma de membrana amniótica
2. Medir proliferación celular en presencia de componentes estructurales de membrana amniótica por separado

MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Obtención de membrana amniótica bajo condiciones de esterilidad, a través del Instituto Nacional de Perinatología, se lavó con antibióticos de amplio espectro, y se colocó en DMEM y glicerol v/v (glicerol al 50% en Dulbecco's Modified Eagle Medium). Las piezas obtenidas se colocaron en papel de nitrocelulosa con epitelio hacia arriba. Los fragmentos obtenidos se ultracongelaron a -80° (Figura 2).

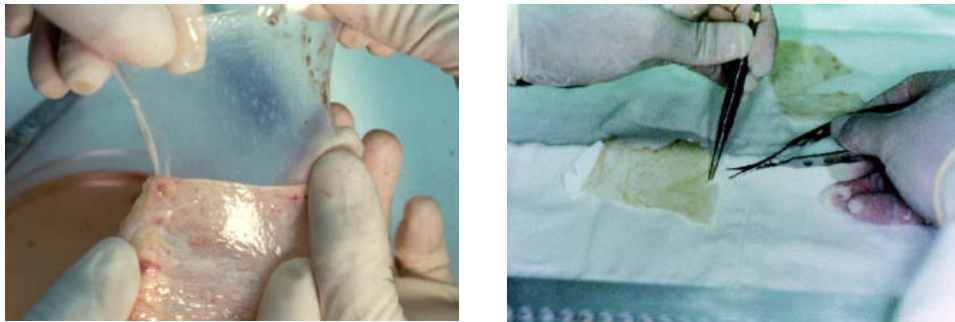


Figura 2. En la figura de la izquierda se observa la separación del amnios del corion. En la figura de la derecha se observa la colocación de la membrana amniótica sobre el papel de nitrocelulosa, epitelio hacia arriba. Nótese que todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

2. Obtención de células madre de rodetes obtenidos durante cirugías de trasplante de córnea realizadas en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana y cultivo de las mismas en medio selectivo (Keratonocyte Serum Free Medium) (Fig 3)

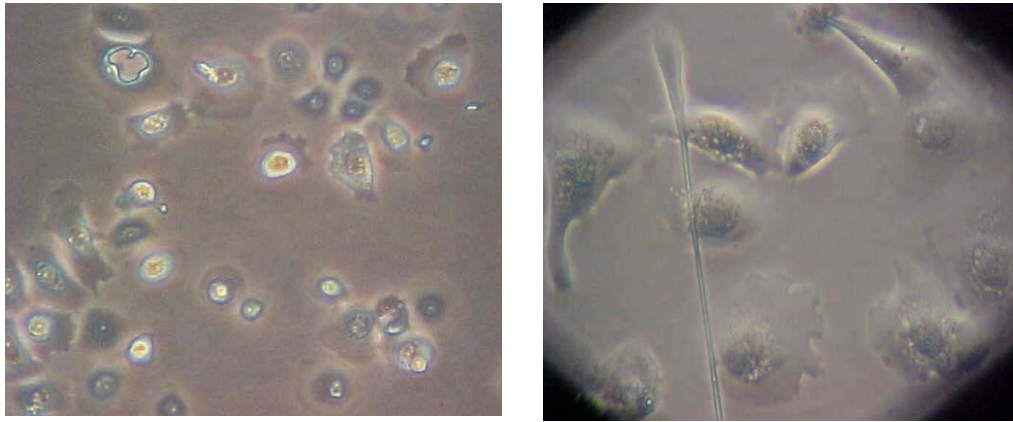


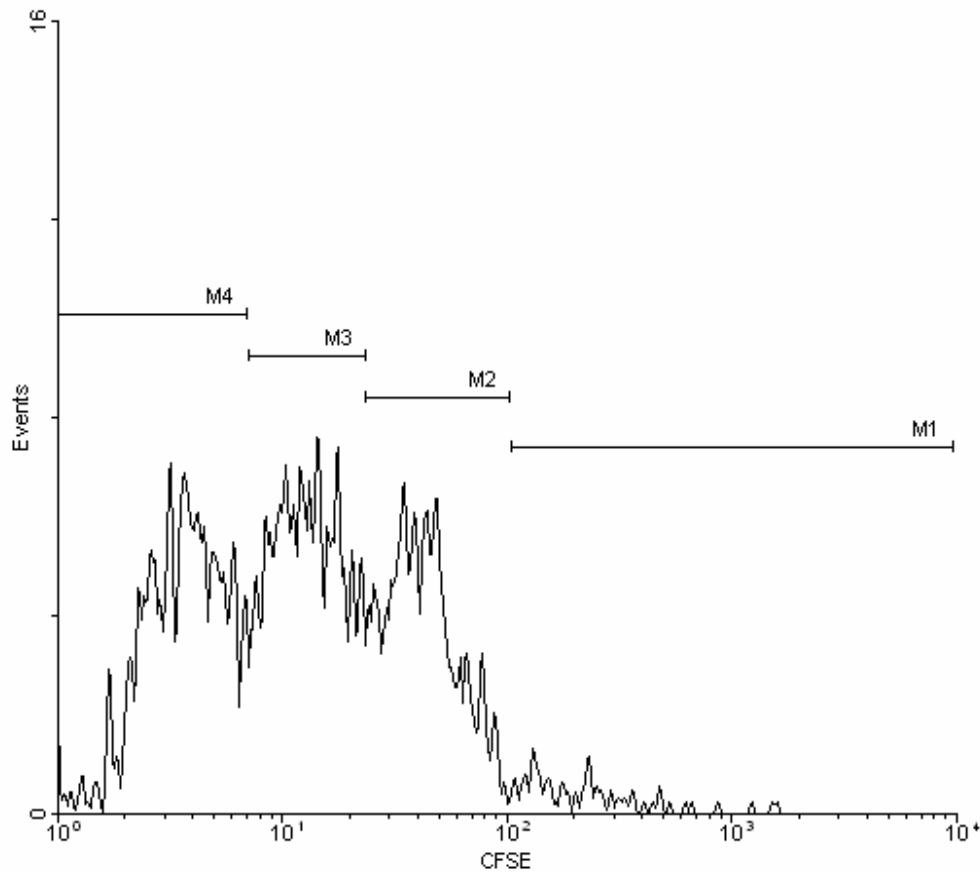
Figura 3. Microfotografía por microscopio invertido con contraste de fases. En la figura de la izquierda se observan células epiteliales limbales a 200x y en la figura de la derecha se observan células epiteliales limbales 400x.

3. Tinción intracelular con CFSE (5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Para determinar la proliferación celular, se incubaron las células con 0.5 mM de CFSE durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se paró la reacción con medio suplementado con suero fetal bovino. Las células marcadas se cultivaron por 96 h con diferentes estímulos. Fueron cosechadas y analizadas mediante citometría de flujo.

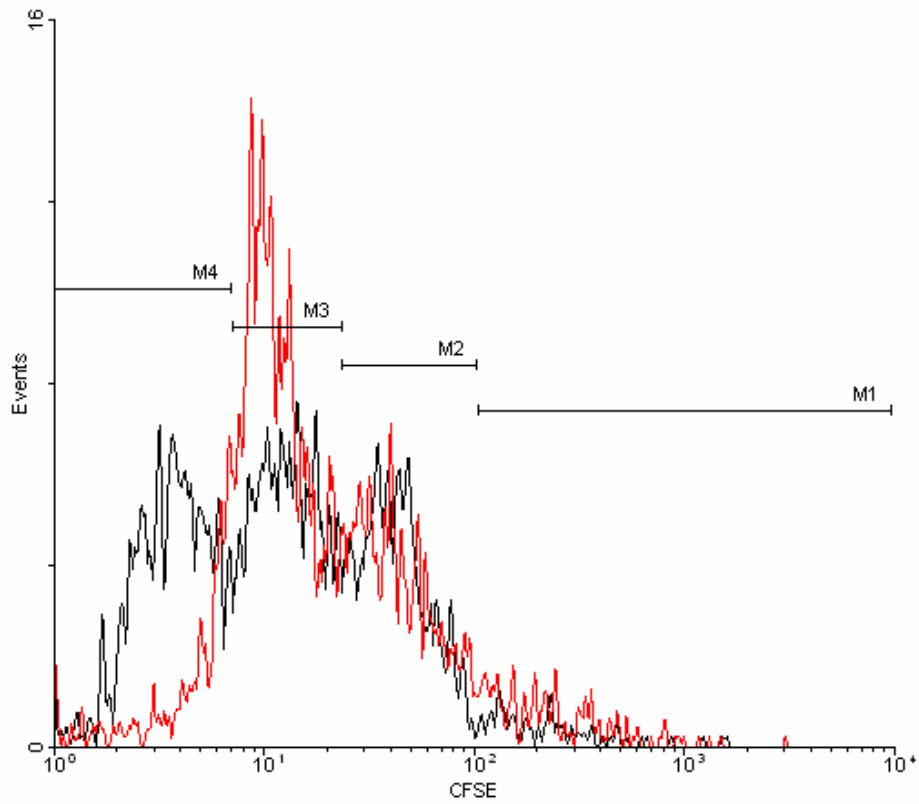
4. Realización de cultivos de células madre (1×10^5) durante 96 horas con
 - 4.1 Membrana amniótica
 - 4.2 Ácido hialurónico 0.1 mg/mL
 - 4.3 Fibronectina 0.03 mg/mL
 - 4.4 Laminina 0.007 mg/mL
 - 4.5 Plástico

RESULTADOS:

Se realizaron cultivos celulares por triplicado con los diferentes componentes, mediante el análisis con citometría de flujo obtuvimos gráficas como las siguientes, en el eje de las X se mide la concentración de CFSE (5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) y en el eje de las Y el número de eventos. En M1, se determinaron las células sin mitosis; en M2 las células con una mitosis; en M3 las células con 2 mitosis; en M4 las células con tres mitosis.



Gráfica 1. Citometría de flujo de cultivo en plástico



Gráfica 2. Citometría de flujo de cultivo con fibronectina

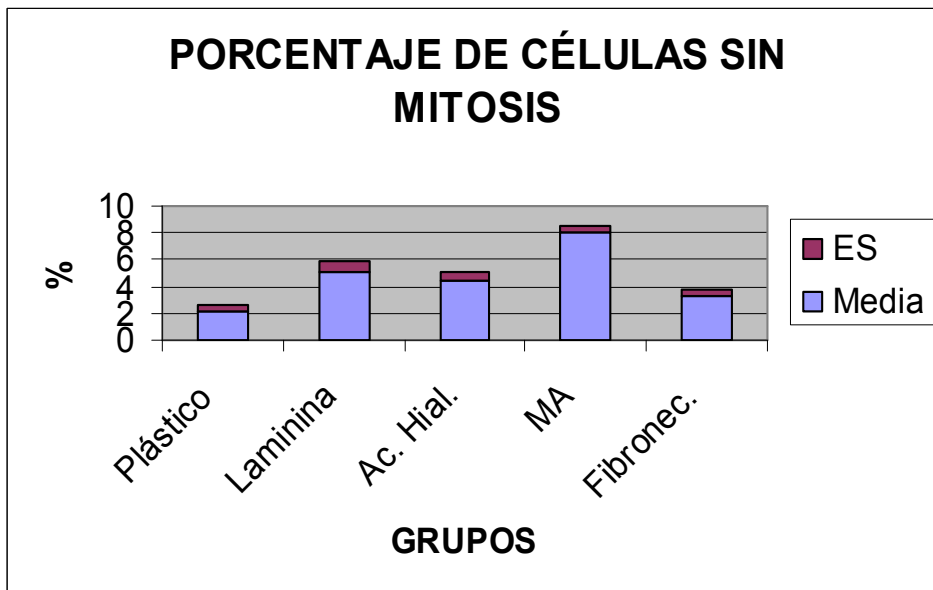


Tabla 1. Porcentaje de células sin mitosis

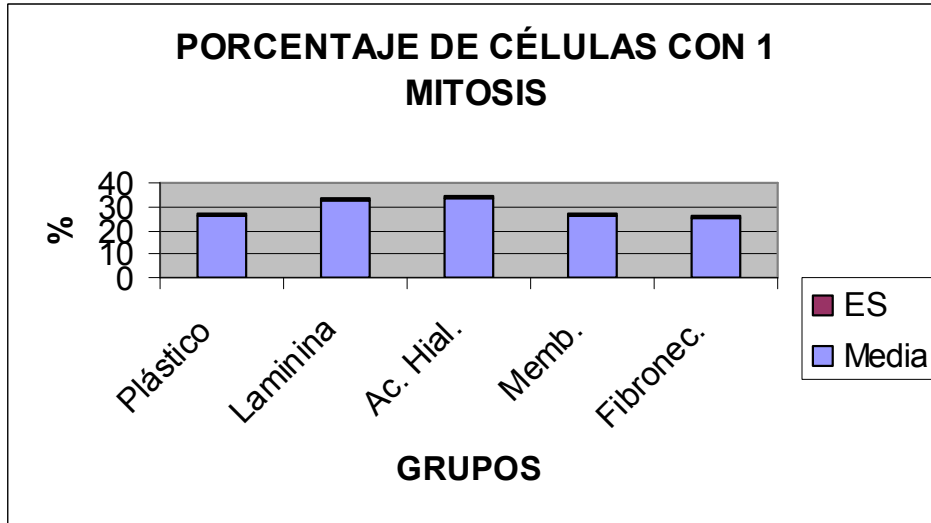


Tabla 2. Porcentaje de células con 1 mitosis

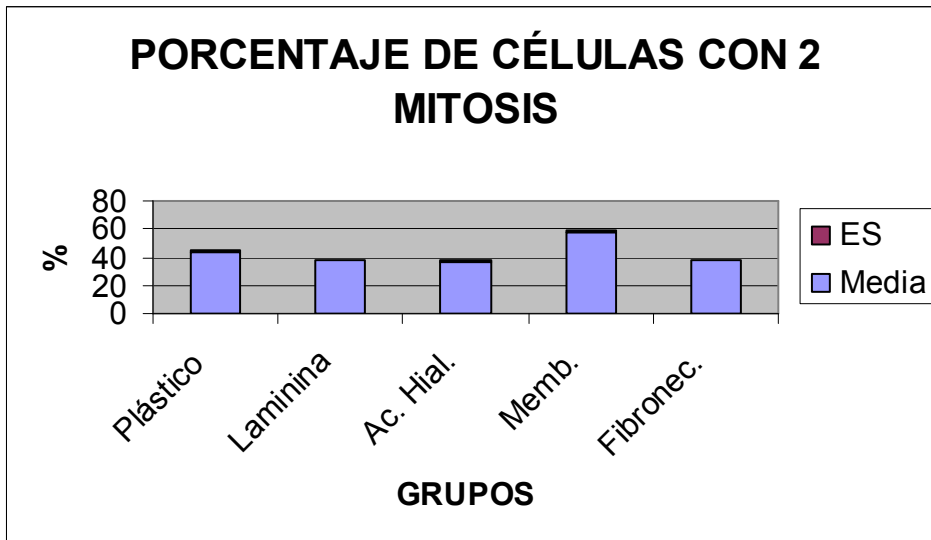


Tabla 3. Porcentaje de células con 2 mitosis

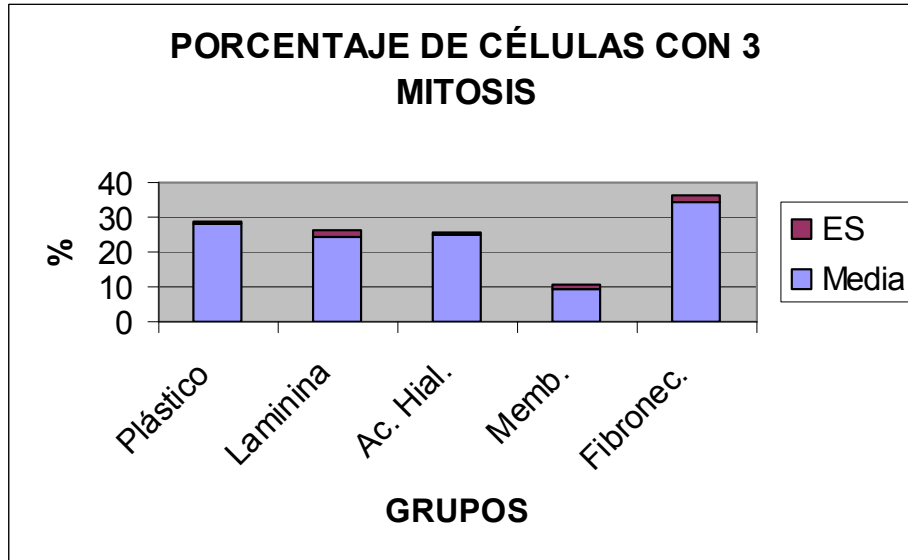


Tabla 4. Porcentaje de células con 3 mitosis

Se encontró un mayor número de células sin mitosis en los cultivos con membrana amniótica y en plástico, la mayor cantidad de células con una mitosis fue para los cultivos realizados con laminina y ácido hialurónico.

La membrana amniótica presentó un mayor porcentaje de células con dos mitosis, y disminuye de manera importante para la tercer mitosis.

Se demostró una gran cantidad de células con tres mitosis en los cultivos realizados con fibronectina seguido de plástico.

CONCLUSIONES

La membrana amniótica ha demostrado ser útil en la reconstrucción de la superficie ocular, se le han atribuido múltiples efectos como antiinflamatorio, antiangiogénico, inhibidor de fibroblastos y actuar como substrato celular.

En este estudio encontramos que la membrana amniótica es buena promotora de proliferación celular, sobretodo para la segunda mitosis de las células preexistentes, sin embargo, algunos de sus componentes estructurales por separado demostraron un comportamiento global similar.

La fibronectina obtuvo una mayor cantidad de células con 3 mitosis de manera significativa, esto nos habla de ser un buen promotor para la proliferación celular.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 47-58.
2. Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102:1476-85.
3. Dua HS, Gomes JAP, King AJ. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49-1: 51-77
4. Lee HS, Kim Jc: Effect of amniotic fluid in corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation. *Cornea*. 1996; 15:517-24.
5. Pires RT, tseng SCG, Prabhasawat P: Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 1291-7.
- 6 . Kurpakus MA, Daneshvar C, Davenport JKA: Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res*. 1999; 19: 106-14.
7. Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial cells by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:329.
8. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D. Supression of interleukin ! alpha and interleukin 1 beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 444-9
9. Hao Y, Ma DH, Hwang DG. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000 19:348-52.
10. Kubo M, Sonada Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of Human Amniotic Membrana in Experimental Xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 1539-6.

11. Hrdlickova-Cela E, Plzak J, Smetana Jr, et al. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease status and immunohistochemical and lectin histochemical análisis in human corneal and conjuntival epithelium. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1336-1340.

12. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathology*. 2000; 156: 899-909.