

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES

**TESIS DOCTORAL**

Desarrollo de modelos  
experimentales de prótesis de  
córnea humanizada autóloga

---



**JORGE L. ALIÓ DEL BARRIO**

**2014**

# Desarrollo de modelos experimentales de prótesis de córnea humanizada autóloga

---

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES, FACULTAD DE MEDICINA, MADRID



LABORATORIO DE INGENIERÍA CELULAR, HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ,  
MADRID

INSTITUTO OFTALMOLÓGICO VISSUM Y UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ,  
ALICANTE

CENTRO DE BIOMATERIALES E INGENIERÍA TISULAR, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE  
VALENCIA

CENTRO TECNALIA, SAN SEBASTIÁN

---

## **Jorge L. Alió del Barrio**

Ldo. Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid; Médico Especialista en Oftalmología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

*Londres, Marzo 2014*



---

Arriba se exponen los logos de los centros participantes en la presente tesis doctoral.  
En orden de izquierda a derecha y de arriba abajo:

- Laboratorio de Ingeniería Celular, Hospital Universitario La Paz, Madrid.
- Instituto Oftalmológico Vissum y Universidad Miguel Hernández, Alicante.
- Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Centro Tecnalía, San Sebastián.

## **Documento 1**

**Firmas de Directores de Tesis (3)**

## **Documento 2**

**Firma de Catedrático de Cirugía (1)**

Este trabajo ha sido financiado por:

- El Ministerio Español de Ciencia e Innovación (IAP-560610-2008-44 y SAF2010-19230).
- El Ministerio Español de Sanidad, Fondo de Investigaciones Sanitarias (CEN-20091021).
- La Fundación Marató de TV3, España.

*A mi madre por la educación recibida y los valores inculcados.*

*A mi padre por la inspiración, apoyo y ejemplo profesional.*

*A mi hermana, cuñado y sobrinos por la ayuda técnica y el sosiego que aportan cuando lo demás está tenso.*

*A Alejandra, mi prometida, por la feliz vida que nos espera juntos y la familia que construiremos.*

# ***Agradecimientos***

Sin lugar a dudas esta tesis doctoral, de la que me siento muy orgulloso, no habría podido realizarse sin la ayuda de una gran cantidad de personas a las cuales, como mínimo, les debo mi más sincera gratitud.

En primer lugar querría dar las gracias a mi magnífica directora de tesis, María de Miguel, por su paciencia a la hora de introducirme en el mundo de la investigación básica y por enseñarme a querer y mimar a las células madre como si fuesen mis mascotas. Su influencia y ayuda han sido y siguen siendo críticas en mi introducción en el mundo de la investigación y sin duda marcarán mi futuro profesional.

También debo nombrar al excelente equipo del Laboratorio de Ingeniería Celular del Hospital La Paz liderado por María (Fátima, Shere, Yago, Pilar y Alejandro), por la ayuda que me ofrecieron en esos primeros meses en los que andaba totalmente perdido por el laboratorio, y en especial querría acordarme de Nacho y Massimo, mis compañeros codo con codo en estos años y sin los cuales este trabajo no habría sido posible....les deseo lo mejor para el futuro y espero que obtengan el éxito que sin duda se merecen.

Muchas gracias a todo el equipo de Vissum Alicante: a Laurent por la excelente y muchas veces complicada labor organizativa; a Alejandra, Elías, Alessandro y Amr el Aswad por la enorme ayuda ofrecida con la parte *in vivo* del proyecto; y al patólogo Severino Rey por resolver nuestras dudas histológicas.



Muchas gracias a todo el equipo médico del servicio de oftalmología del Hospital Ramón y Cajal liderado de una manera excelente por Francisco Muñoz Negrete, por todo el cariño y enseñanza dada todos estos años que me han permitido desarrollarme como persona y como oftalmólogo. Querría mencionar a parte al equipo de córnea (Rafa, Miguel, Jose Antonio y Francisco) por haber sido los responsables de que en estos momentos me encuentre realizando la especialización en córnea/segmento anterior, y especial mención merece Francisco Arnalich, cuya tesis doctoral inspiró la presente y quien sin duda ha sido un magnífico referente en mi vida profesional y cuyos pasos estoy intentando seguir.

Por supuesto no puedo olvidarme de mi futura esposa, Alejandra Amesty, por la ayuda y compañía ofrecida durante muchas de las revisiones, ni de mi familia, compañeros de residencia y amigos por la felicidad que me han dado durante todos estos años.

Por último, pero no por ello menos importante, querría acordarme de mi segundo director de tesis y a la vez mi padre, sin el cual no me encontraría en estos momentos escribiendo estas palabras. Gracias por introducirme en este mundo y por la confianza depositada.

Muchas gracias y un fuerte abrazo a todos

Jorge L. Alió del Barrio

# *Índice*

---

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN Y SUMMARY.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
1. EL ESTROMA CORNEAL: ANATOMÍA Y ESTRUCTURA.....	15
1.1 <i>Estructura del estroma corneal.....</i>	<i>18</i>
1.1.1 Células.....	18
1.1.2 Matriz extracelular.....	19
1.2 <i>Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio.....</i>	<i>22</i>
2. PATOLOGÍAS DEBILITANTES CORNEALES.....	23
3. LA CICATRIZACIÓN Y REGENERACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL.....	25
4. LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: SU CARÁCTER PLURIPOTENCIAL.....	29
4.1 <i>La célula madre: conceptos básicos.....</i>	<i>29</i>
4.2 <i>Aplicaciones básicas de las células madre.....</i>	<i>30</i>
4.3 <i>Tipos de células madre corneales.....</i>	<i>31</i>
4.4 <i>La célula madre adulta: transdiferenciación.....</i>	<i>32</i>
4.5 <i>Las células madre mesenquimales adultas.....</i>	<i>33</i>
4.6 <i>Las células madre mesenquimales adultas derivadas del tejido adiposo (ADASC).....</i>	<i>35</i>
A) Regeneración tisular directa .....	36
B) Regeneración tisular indirecta: ADASC como biorreactores.....	37
C) Reclutamiento de progenitores celulares.....	38

D) Inmunomodulación.....	38
5. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE ORIGEN ADIPOSO EN LA REGENERACIÓN CORNEAL.....	40
5.1 <i>Aplicaciones en la regeneración del epitelio corneal.....</i>	40
5.1.1 Contexto actual de la regeneración del epitelio corneal con células madre-no ADASC.....	40
5.1.2 Regeneración del epitelio corneal con células madre ADASC.....	41
5.2 <i>Aplicaciones en la regeneración del estroma corneal.....</i>	42
5.2.1 Transdiferenciación de ADASC a queratocitos <i>in vitro</i> .....	42
5.2.2 Transdiferenciación de ADASC a queratocitos <i>in vivo</i> .....	42
5.3 <i>Aplicaciones en la regeneración del endotelio corneal.....</i>	44
6. AVANCES EN BIOINGENIERÍA TISULAR CORNEAL.....	45
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....</b>	<b>53</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
7. ASPECTOS GENERALES.....	58
7.1 <i>Descripción breve del proyecto.....</i>	58
7.2 <i>Obtención de la población celular LPA: procesamiento del tejido     adiposo humano.....</i>	59
7.3 <i>Cultivo de la población celular LPA.....</i>	61
8. PRÓTESIS DE POLIACRILATO DE ETILO (PEA): ESTUDIOS IN VITRO.....	61
8.1 <i>Nomenclatura de los biomateriales empleados.....</i>	61
8.2 <i>Evaluación de las características biofísicas de los     biomateriales.....</i>	63
8.3 <i>Estudio de colonización celular de las Referencias 1-7 con/sin     biofuncionalización con Fibronectina.....</i>	63

---

8.4 <i>Estudio de colonización celular de los biomateriales seleccionados con/sin biofuncionalización con colágeno/queratán sulfato</i> .....	65
8.5 <i>Estudio de colonización celular de los biomateriales seleccionados con/sin biofuncionalización con el péptido funcional FN7-10</i> .....	65
9. LÁMINA DE CórNEA HUMANA DESCeLULARIZADA: ESTUDIOS IN VITRO.....	66
9.1 <i>Técnica de descelularización corneal</i> .....	66
9.2 <i>Estudio de colonización celular de las láminas corneales humanas descelularizadas</i> .....	68
10. PRÓTESIS DE PEA / LÁMINA DE CórNEA HUMANA DESCeLULARIZADA: ESTUDIOS IN VIVO.....	69
10.1 <i>Preparación de las prótesis en el laboratorio</i> .....	69
10.1.1 Cultivo de las células ADASC.....	69
10.1.2 Marcaje celular de las ADASC.....	69
10.1.3 Siembra celular de las prótesis.....	70
10.1.4 Transporte.....	71
10.1.5 Prótesis control.....	72
10.1.6 Enmascaramiento del diseño experimental.....	72
10.2 <i>Protocolo quirúrgico</i> .....	72
10.2.1 Modelo animal.....	72
10.2.2 Diseño.....	73
10.2.3 Procedimiento quirúrgico.....	73
10.3 <i>Protocolo postquirúrgico</i> .....	76
10.3.1 Tratamiento postquirúrgico.....	76
10.3.2 Seguimiento postquirúrgico.....	76
10.3.3 Eutanasia.....	80
10.4 <i>Análisis postmortem</i> .....	80

10.4.1 Anatomía patológica.....	80
10.4.2 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil.....	81
10.4.3 Inmunohistoquímica del proteoglicano queratocán.....	81
<b>11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS.....</b>	<b>82</b>
11.1 <i>Estudios in vitro</i> .....	82
11.2 <i>Estudios in vivo</i> .....	82
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>12. PRÓTESIS DE POLIACRILATO DE ETILO (PEA): ESTUDIOS IN VITRO.....</b>	<b>84</b>
12.1 <i>Evaluación de las características biofísicas de los biomateriales</i> .....	84
12.2 <i>Estudio de colonización celular de las Referencias 1-7 con/sin biofuncionalización con Fibronectina</i> .....	85
12.3 <i>Estudio de colonización celular de las Referencias 1 y 2 con/sin biofuncionalización con colágeno/queratán sulfato</i> .....	87
12.4 <i>Estudio de colonización celular de las Referencias 1 y 2 con/sin biofuncionalización con el péptido funcional FN7-10</i> .....	89
<b>13. LÁMINA DE CÓRNEA HUMANA DESCELULARIZADA: ESTUDIO DE COLONIZACIÓN CELULAR IN VITRO.....</b>	<b>90</b>
13.1 <i>Fluorescencia del marcador Vybrant CM-Dil</i> .....	90
13.1.1 Lámina en fresco.....	90
13.1.2 Lámina fijada en formol e incluida en parafina.....	91
13.2 <i>Tinción con hematoxilina-eosina</i> .....	91
<b>14. PRÓTESIS DE POLIACRILATO DE ETILO (PEA): ESTUDIOS IN VIVO.....</b>	<b>92</b>
14.1 <i>Selección del biomaterial</i> .....	92

---

14.2 Referencia 1.....	92
14.2.1 Cirugías.....	92
14.2.2 Seguimiento postquirúrgico.....	93
14.2.3 Análisis histológico.....	96
14.2.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil.....	98
14.2.5 Inmunohistoquímica del queratocán.....	99
14.3 Referencia 2.....	99
14.3.1 Cirugías.....	99
14.3.2 Seguimiento postquirúrgico.....	100
14.3.3 Análisis histológico.....	102
14.3.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil.....	103
14.3.5 Inmunohistoquímica del queratocán.....	103
14.4 Referencia 4.....	104
14.4.1 Cirugías.....	104
14.4.2 Seguimiento postquirúrgico.....	104
14.4.3 Análisis histológico.....	107
14.4.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil.....	108
14.4.5 Inmunohistoquímica del queratocán.....	108
15. LÁMINA DE CÓRNEA HUMANA DESCELULARIZADA: ESTUDIOS IN VIVO.....	109
15.1 Cirugías.....	109
15.2 Seguimiento postquirúrgico.....	109
15.3 Análisis histológico.....	114
15.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil + IHQ del queratocán.....	117

---

15.5 Comparativa clínica: Láminas descelularizadas versus Membranas macroporosas de PEA.....	119
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>120</b>
16. MEMBRANAS MACROPOROSAS DE POLIETIL ACRILATO (PEA).....	122
16. LÁMINAS DE CÓRNEA HUMANA DESCCELULARIZADA.....	126
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>136</b>



# *Abreviaturas*

---

**AAC:** Ácido acrílico

**ADASC:** Células madre adultas derivadas del tejido adiposo

**ADN:**Ácido desoxirribonucleico

**ALDH:**Aldehído deshidrogenasa

**BM-MSC:** Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea

**CK:** Citoqueratina

**DALK:** Queratoplastia lamelar anterior profunda

**DAPI:** Diamidino-2-phenylindone

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DSAEK:** Descemet stripping automated endothelial keratoplasty

**Epi:** Epitelio

**ESC:** Células madre embrionarias

**FBS:** Suero bovino fetal

**FVS:** Fracción vascular estromal

**HA:** Ácido hialurónico

**HEA:** hidroxietilacrilato

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IL:** Interleuquina

**KS:** Queratán sulfato

**LASIK:** Láser *in situ* keratomileusis

**LESC:** Células madre epiteliales limbares

**LPA:** Lipoaspirado procesado

**MAAc:** Ácido metacrílico

**MSC:** Células madre mesenquimales

**OOKP:** Osteo-odonto-queratoprótesis

**PBS:** Solución tampón fosfato salino

**PEA:** Polietilacrilato

**pHEMA:** Poli-2-hidroxietilmetacrilato

**PMMA:** Polimetilmetacrilato

**PMN:** Polimorfonucleares

**Ref:** Referencia

**SDS:** Sodium dodecyl sulfate

**SMILE:** Small incision lenticule extraction

**Str:** Estroma

**TGF:** Factor de crecimiento transformante

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**UMSC:** Células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

# *Resúmenes*

---

La regeneración corneal es una etapa esencial en la restitución de la normalidad anatómica en las patologías debilitantes de la córnea. El objetivo en esta tesis doctoral es el desarrollo de biomateriales transportadores de células autólogas humanas de tipo pluripotencial, con la finalidad de promover la integración de dichos biomateriales y regenerar el estroma en las córneas estructuralmente debilitadas.

En una primera fase analizamos las propiedades físicas *in vitro* de injertos porosos de 90µm de espesor de polietilacrilato (PEA) y estroma corneal humano descelularizado, además de analizar la capacidad de proliferación, infiltración y adhesión de células madre derivadas del tejido adiposo humano (ADASC) sobre los mismos. En una segunda fase se estudió el comportamiento *in vivo* de estos dos tipos de implantes con y sin colonización celular mediante un ensayo controlado y triple enmascarado, usando un modelo experimental de conejo albino neozelandés. Los implantes se introdujeron dentro de bolsillos intraestromales disecados manualmente y se realizó un seguimiento completo de 3 meses, donde se analizaron clínicamente la inyección conjuntival, transparencia y vascularización corneal. Tras la eutanasia de los conejos se realizó un análisis histológico e histoquímico con el objetivo de evaluar la supervivencia de las ADASC y su diferenciación en queratocitos adultos.

La prótesis de PEA con un 10% de hidroxietilacrilato redujo drásticamente su tasa de extrusión, pudiendo ser utilizado como scaffold en futuros modelos de queratoprótesis. Las láminas de córnea humana descelularizada con posterior recelularización demostraron una óptima biointegración en el estroma corneal en ausencia de respuesta inflamatoria alguna, además de permitir una mejor supervivencia y diferenciación de las células madre en comparación con las membranas de PEA. Este modelo de trasplante lamelar mediante descelularización con posterior recelularización con células madre extraoculares permite la obtención de injertos lamelares funcionalizados autólogos a partir de córneas alogénicas.

**Summary:** Corneal regeneration is an essential step in the restoration of normal anatomy after debilitating diseases of the cornea. The objective on this doctorate project is to develop biomaterials that work as carriers for autologous pluripotent human cells, in order to promote their integration and regenerate the stroma in structurally weakened corneas.

In a first step we analyzed the *in vitro* physical properties of 90µm-thick grafts of polyethylacrylate (PEA) and decellularized human corneal stroma, as well as the ability of proliferation, infiltration and adhesion of human adipose tissue derived stem cells (ADASC) on them. In a second step we studied the *in vivo* behavior of these two types of implants with and without cellular colonization by a controlled and triple masked trial, using an experimental New Zealand rabbit model. The implants were introduced into manually dissected stromal pockets, and a complete follow up of 3 months was carried out, clinically analyzing the conjunctival injection, and the corneal transparency and vascularization. After euthanasia of the rabbits a histological and histochemical study of the corneas was conducted in order to evaluate the survival of ADASC and their differentiation into adult keratocytes.

The PEA membranes with 10% hydroxyethylacrilate drastically reduced their extrusion rate and can be used as a scaffold for future models of keratoprosthesis. The decellularized human corneal sheets with subsequent recellularization showed an optimum biointegration in the corneal stroma in the absence of any inflammatory response, and allowed better survival and differentiation of stem cells as compared to the PEA membranes. This lamellar transplant model by decellularization with subsequent extraocular stem cell recellularization allows to obtain functionalized autologous lamellar grafts from allogeneic corneas.

# *Introducción*

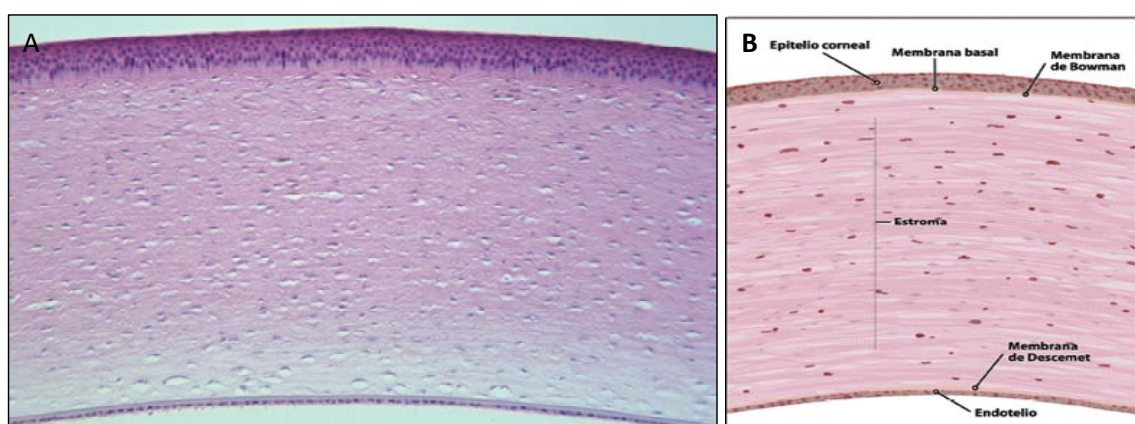
---

## 1. El estroma corneal: anatomía, características estructurales :

La córnea forma junto con la esclera la carcasa externa del globo ocular, ocupando un tercio de la misma. Aunque ambos están compuestos de un tejido conectivo denso casi en su totalidad, las funciones fisiológicas de cada uno de estos tejidos son muy diferentes. La córnea sirve de “ventana” transparente avascular que permite la entrada de luz al ojo, mientras que la esclera proporciona las “paredes” opacas que permiten la formación de la imagen en la retina.

En la función óptica de la córnea no sólo es fundamental su transparencia, sino que también lo es su morfología, con una superficie corneal anterior convexa y asférica que determina el poder refractivo de la misma, que en condiciones normales es de 40 a 44 dioptrías, suponiendo aproximadamente dos tercios del poder refractivo total del ojo.

La córnea se compone de cinco capas diferenciadas (Figura 1): tres capas celulares cuya integridad es fundamental para el mantenimiento de la transparencia corneal (epitelio, estroma y endotelio), y dos capas de interfase entre ellas (capa de Bowman y membrana de Descemet) (Nishida y cols., 2011):



**Figura 1.-** Histología de la córnea humana normal. A: Corte histológico teñido con H&E (200x). B: Esquema de los componentes de la córnea.



El **epitelio** corneal se compone de un epitelio escamoso estratificado no queratinizado, con un grosor normal de unas 50  $\mu\text{m}$ , que supone un 10% del grosor total de la córnea. Se compone de cinco o seis capas de células epiteliales en tres estadios diferentes de diferenciación, el primero de los cuales se compone de las células basales, que son las únicas células epiteliales con capacidad de proliferación y que se adhieren mediante hemidesmosomas a su membrana basal, que se encuentra adyacente a la capa de Bowman. Los diferentes tipos de uniones intercelulares presentes en el epitelio corneal le confieren su función de barrera protectora ocular (tight junctions o *zonula occludens*, hemidesmosomas o *zonula adherens*, desmosomas, y gap junctions). A nivel de los hemidesmosomas de las células basales existe un entramado de fibrillas de colágeno tipo VII (fibrillas de anclaje) que unen estas células a la membrana basal, a la membrana de Bowman y al estroma anterior, donde se fijan mediante placas de colágeno tipo IV, tipo VII y laminina (placas de anclaje), en conexión con el colágeno tipo I del estroma (su principal componente). Constituyen en su conjunto complejos de unión muy fuertes (Gipson y cols., 1987).

Bajo el epitelio encontramos una membrana basal de aproximadamente 75nm de espesor. Sus principales componentes son el colágeno tipo IV y la laminina, y al microscopio electrónico se puede observar que está formada por una zona clara anterior de 25 nm (*lámina lúcida*) y una zona oscura posterior de 50 nm (*lámina densa*). Junto con los hemidesmosomas y las fibrillas de anclaje, la membrana basal juega un papel muy importante en la unión del epitelio corneal con la membrana de Bowman.

Adyacente a la membrana basal epitelial se encuentra la capa de Bowman, un tejido acelular compuesto de colágeno y proteoglicanos de 12  $\mu\text{m}$  de grosor, de relevancia poco conocida pues no está presente en todos los mamíferos y no se regenera tras su eliminación, sin que ello determine condición patológica alguna para el ojo (epitelio y membrana basal recubren la superficie dañada, persistiendo únicamente un leve adelgazamiento residual por la capa de

Bowman no regenerada). Compuesta fundamentalmente de colágenos tipo I y III secretados por los queratocitos estromales (principal componente celular del estroma), esta capa es considerada la porción más anterior del estroma corneal (Nishida y cols., 2011).

El **estroma** constituye más del 90% del grosor corneal. Muchas de las características de la córnea, incluyendo su resistencia, estabilidad en la morfología y transparencia, son atribuibles a la anatomía y propiedades biomecánicas del estroma. La distribución uniforme, y el lento pero continuo recambio de las fibras de colágeno del estroma, son esenciales para el mantenimiento de la transparencia corneal. Más adelante expondremos en detalle la anatomía y propiedades biomecánicas de este estrato corneal.

La membrana de Descemet separa el estroma del endotelio corneal, y es en realidad una membrana basal producida fundamentalmente por el endotelio, con un espesor de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  en el adulto, y cuya función es adherir fuertemente el endotelio al estroma corneal. Al microscopio electrónico, la membrana de Descemet aparece como un enrejado de fibrillas de colágeno tipo IV y VIII, laminina y fibronectina, y consta de una zona estriada anterior (que se desarrolla durante la vida intrauterina), y una zona no estriada posterior (que se establece a lo largo de la vida). En su conjunto, la membrana de Descemet es una estructura muy elástica, capaz de regenerarse y muy resistente a la acción de enzimas proteolíticas. Por este motivo, en úlceras corneales graves, esta membrana resiste formando un *descematocele*.

El **endotelio** corneal se compone de una monocapa de células metabólicamente activas, de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, cuya misión fundamental es la de extraer el exceso de agua en el estroma corneal mediante ATPasas, evitando así un exceso de hidratación estromal, lo cual es fundamental para el mantenimiento de la transparencia corneal. Entre estas células existen numerosas uniones herméticas tipo *mácula occludens* (menos fuertes que las *zonula occludens* del epitelio, por lo que la barrera endotelial no es tan eficaz como la epitelial) (Mac Laughlin y cols., 1985), así como gap junctions, y en menor cantidad otras como *macula adherens* o

*zonula occludens*. Tradicionalmente se pensaba que estas células endoteliales corneales no tenían capacidad de regeneración en el ser humano, no existiendo mitosis tras el nacimiento. De este modo, habría una disminución progresiva del número de células endoteliales con la edad, por lo que las células remanentes aumentarían su tamaño para cubrir todo el espacio corneal. Distintos investigadores han demostrado que el endotelio corneal humano, como el resto de tejidos del organismo, posee cierto número de células madre indiferenciadas y, por lo tanto, esta capa pudiera ser capaz de proliferar y regenerarse en el adulto, aunque en un grado muy bajo (Whikehart y cols., 2005). También se ha demostrado que las células endoteliales adultas sí poseen capacidad de proliferación en cultivos celulares, pero *in vivo* se encuentran atrapadas en fase G1 (no proliferativa) del ciclo celular (Joyce., 2003).

## 1.1 Estructura del estroma corneal:

Este tejido conectivo denso con alto nivel de organización está constituido por células y matriz extracelular (Nishida y cols., 2011):

### 1.1.1 Células.

Los queratocitos son el componente celular predominante del estroma corneal, y se cree que se renuevan cada 2 o 3 años. Se trata de células derivadas de la cresta neural, de aspecto aplanado y morfología estrellada, que se distribuyen entre las lamelas del estroma. Estas células proyectan largos procesos que se conectan, mediante uniones GAP, con los procesos de las células vecinas, formando así un enrejado tridimensional que contiene en su interior la matriz extracelular secretada por ellas mismas.

Los queratocitos son morfológicamente similares a los fibroblastos y poseen un extenso citoesqueleto intracelular, incluyendo prominentes filamentos de actina. En general, los queratocitos son quiescentes en la córnea normal, pero en respuesta a diferentes tipos de

agresiones al estroma (con importante mediación del transforming growth factor beta o TGF-beta) tienen la capacidad de activar su metabolismo y transdiferenciarse en fibroblastos y miofibroblastos (Garana y cols., 1992), los cuales intervienen en la regeneración y cicatrización del tejido (Matsuda y Smelser., 1973). Los miofibroblastos sufren un cambio sustancial en la expresión de las moléculas que componen su citoplasma, expresando entre otras la actina sarcomérica o  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), la cual proporciona a la célula habilidad contráctil que contribuye al cierre de la herida (Jester y cols., 1995a,1996,1999b). Se ha sugerido que, mientras los miofibroblastos corneales juegan un papel importante fundamentalmente en la contracción de la herida, son los fibroblastos corneales los principales responsables de la síntesis y remodelación del tejido, mediante la síntesis de las moléculas de la nueva matriz extracelular así como de proteínas que degradan la misma (colagenasas y metaloproteinasas) (Ruberti y cols., 2008). La pérdida de la ultraestructura del colágeno original conduce a la pérdida de transparencia del tejido.

La capacidad de renovación de los queratocitos estromales no está muy bien definida y, hasta hace poco, se dudaba de la presencia de células madre de esta población. Estudios previos habían demostrado que los queratocitos corneales expresan CD34, un marcador de células madre hematopoyéticas (Toti y cols., 2002). La literatura más reciente ha puesto de manifiesto un precursor de queratocitos, localizado en el estroma corneal limbar, que expresa marcadores de células madre adultas como el ABCG2 (ATP binding cassette G2) y PAX6 (Paired box 6), el cual además es capaz de diferenciarse a cartílago y a células nerviosas en el medio adecuado (Du y cols., 2005).

### 1.1.2 Matriz extracelular.

Formada por:

- **Colágeno:** El componente celular ocupa solamente el 2-3% del volumen del estroma,

mientras que el colágeno supone más del 70% del peso de la córnea deshidratada. El colágeno del estroma corneal es mayoritariamente de tipo I (75%), con menores cantidades de colágenos tipo VI (17%) y V (2%) (Zimmermann y cols., 1986). Los colágenos tipo III, XII y XIV también están presentes en el estroma aunque en escasa proporción (Shaw y Olsen., 1991).

Las fibras de colágeno se disponen de forma paralela. El diámetro medio de las fibras de colágeno (22.5-35 nm) y la distancia media entre ellas ( $41.4 \pm 0.5$  nm) en el estroma son bastante homogéneos, y son menores que la mitad de la longitud de onda de la luz visible (400-700nm). Esta regular y uniforme distribución anatómica es la principal responsable de la transparencia corneal.

En el estroma corneal, las fibras de colágeno forman unas 300 lamelas, y su renovación es lenta, requiriendo unos 2 ó 3 años.

Entre estas fibras se distribuyen los proteoglicanos.

- **Proteoglicanos:** Son el componente principal de la matriz que se encuentra entre las fibras de colágeno del estroma. Se componen de un núcleo proteico y cadenas de glicoaminoglicanos unidas covalentemente (Hassell y cols., 1986), los cuales juegan un papel relevante en la fibrillogénesis del colágeno. Con la excepción del hialuronato, el resto de glicoaminoglicanos del estroma corneal están presentes en forma de proteoglicanos. El proteoglicano más abundante en la córnea es del tipo queratán sulfato (suponiendo el 65% del total). En menor proporción también están presentes el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. Los glicoaminoglicanos tienen la capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua gracias a la repulsión generada entre las cargas negativas del queratán y condroitín sulfatos, lo que conduce a la retención interfibrilar de fluido. Esto genera que el estroma tenga tendencia a hidratarse, conocida como “presión de imbibición”, la cual se encuentra en

equilibrio con el resto de factores reguladores de la hidratación corneal (bomba endotelial, barrera epitelial, superficie de evaporación y la presión intraocular). Por esta razón el fracaso de la bomba endotelial conduce a la excesiva hidratación corneal, alterando la perfecta organización de la matriz extracelular estromal. La irregularidad en la distancia interfibrilar conduce a la dispersión de los haces luminosos y por tanto a la opacificación corneal.

Mientras que el papel fundamental de las cadenas de glicoaminoglicanos de los proteoglicanos es regular la hidratación corneal, el papel fisiológico de su corazón proteico no está del todo aclarado: el lumicán, queratocán y mimecán son los cuerpos proteicos presentes en los proteoglicanos del tipo queratán sulfato, mientras que en los proteoglicanos del tipo condroitín y dermatán sulfato los presentes son la decorina y biglicán respectivamente.

La principal diferencia en la composición de la matriz extracelular entre la córnea y la esclera es la ausencia de queratocán en la esclera. De hecho, en adultos, el estroma corneal es el único lugar del organismo donde se expresa el queratocán, característica que no comparten el resto de moléculas de su misma familia (Liu y cols., 2003 ; Meek y cols., 2003). Por esta razón se considera al queratocán como un marcador específico de diferenciación queratocítica.

Estudios recientes han demostrado que mutaciones en el gen del queratocán no afectan a la transparencia corneal pero si a su morfología, produciendo córneas planas (Pellegata y cols., 2000; Liu y cols., 2003). Ratones knockout para lumicán, que es el queratán sulfato más abundante en el estroma corneal, han mostrado una opacificación del mismo edad-dependiente (Chakravarti y cols., 1998 ; Saika y cols., 2000). El knock-out para decorina, que es el menos abundante en el estroma corneal, no produce alteraciones del mismo, sugiriendo

que su papel no es relevante en el mantenimiento de la transparencia corneal (Danielson y cols., 1997).

Durante la cicatrización estromal se modifica la distribución normal de los proteoglicanos, ya que se ha observado que tras la inducción de la transdiferenciación (mediante TGF- $\beta$ ) de los queratocitos estromales hacia fibroblastos y miofibroblastos se observa una marcada reducción de la secreción de los proteoglicanos del tipo queratán sulfato, mientras que los del tipo dermatán sulfato aumentan en tamaño y abundancia. Estos cambios en la composición del estroma corneal conducen a la generación de tejido fibroso con pérdida de transparencia (Funderburgh y cols., 2001).

## 1.2 Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio:

Macroscópicamente, la córnea del conejo común (conejo europeo o *Oryctolagus cuniculus*) es más delgada que la humana. Su espesor aproximado es de 300  $\mu\text{m}$  en el centro y de 400  $\mu\text{m}$  en la periferia, mientras que la córnea humana presenta un espesor central entre 490 y 560  $\mu\text{m}$ , que aumenta hasta 700-900  $\mu\text{m}$  en la periferia.

Histológicamente, la cornea del conejo presenta dos diferencias importantes respecto a la córnea humana: en primer lugar, carece de membrana de Bowman, lo cual contribuye a su menor espesor; en segundo lugar, el endotelio corneal de conejo muestra una gran tendencia a la mitosis (Thomas, 1964; Muñoz y cols., 1990), por lo que estas células, a diferencia de las humanas, tienden a proliferar activamente tanto *in vivo* como *in vitro*.

## 2. Patologías debilitantes corneales:

Como ya se ha comentado, la córnea está formada por tres capas principales (epitelio, estroma y endotelio), y cada una de ellas puede verse afectada, de forma aislada o conjuntamente, por un proceso patológico o lesión que podría originar una opacidad irreversible o un daño estructural y, consecuentemente, una disminución de la agudeza visual. Aunque la queratoplastia penetrante sigue siendo el procedimiento terapéutico estándar para el trasplante de córnea, el método más racional consiste en sustituir exclusivamente el estrato dañado, aproximación que ya realizan técnicas de trasplante muy extendidas en la actualidad como la queratoplastia lamelar anterior profunda (DALK; reemplaza al estroma enfermo del receptor), y la queratoplastia lamelar endotelial (DSAEK/DMEK; reemplaza al endotelio enfermo del receptor) (Nijm y cols., 2011).

Numerosas enfermedades pueden debilitar y alterar la arquitectura normal del estroma corneal, comprometiendo sus funciones ópticas y estructurales, esenciales en la fisiología ocular normal. De una manera muy genérica y simplificada, se podrían clasificar a las enfermedades del estroma corneal en dos grupos:

### 1. **Patologías inflamatorias del estroma corneal:**

- Conjuntivitis severas con afectación secundaria del estroma corneal: tracoma, penfigoide, queratoconjuntivitis atópica, enfermedad injerto contra huésped, síndrome de Stevens-Johnson, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis flictenular, blefaroconjuntivitis en todas sus formas, etc.
- Queratitis infecciosas: víricas (virus herpes simple, virus herpes zoster, adenovirus), bacterianas, fúngicas y amebianas (*Acanthamoeba*).



- Queratitis intersticiales: sifilítica y no sifilítica (Síndrome de Cogan, enfermedad de Lyme, tuberculosis, VHS/VHZ, sarcoidosis, linfomas, etc).
- Queratitis secundarias a enfermedades autoinmunes: conectivopatías (artritis reumatoide, Sjögren, etc), sarcoidosis, idiopáticas (úlceras de Mooren), etc.
- Traumatismos corneales: quemaduras químicas por ácidos o álcalis, inflamación asociada a cuerpos extraños, iatrogenia, etc.

## **2. Patologías no inflamatorias del estroma corneal:**

- Distrofias corneales
- Ectasias corneales: queratocono, queratoglobos, degeneración marginal pelúcida, degeneración marginal de Terrien, ectasia post-LASIK (Laser-Assisted in Situ Keratomileusis).
- Degeneraciones corneales: degeneración nodular de Salzmann, queratopatía en banda, etc.
- Queratopatía neurotrófica
- Queratoconjuntivitis facticias (abuso de anestésicos tópicos).
- Neoplasias: CIN corneal, coristomas, linfomas, etc.

El trasplante alogénico tradicional tiene una tasa de éxito del 80%, la cual depende, en buena medida, de la patología y condición del huésped. Las patologías no inflamatorias, como las ectasias y distrofias, son de bajo riesgo de rechazo (en parte por la ausencia de vascularización de la córnea) presentando estos trasplantes una alta tasa de supervivencia de hasta el 95% (Arentsen y cols., 1983). Por el contrario, las patologías inflamatorias, incluyendo rechazos corneales previos, se asocian normalmente a una alta tasa de rechazo o fallo (vascularización

corneal, inflamación activa, deficiencia de células madre limbares) (Maguire y cols., 1994; Williams y cols., 1992).

Para estos casos de máximo riesgo de rechazo, con fracasos múltiples de injertos previos, se requieren avances en investigación que permitan la generación de modelos de trasplante corneal de nulo o muy bajo riesgo de rechazo, permitiendo ofrecer un pronóstico visual y estético a estos pacientes más complicados. De la misma manera, se requieren avances también en el campo de la bioingeniería tisular (ver más adelante) que permitan el desarrollo de nuevos biomateriales con mejor biointegración en el estroma corneal. En consecuencia se podrían plantear nuevos modelos de queratoprótesis más seguros y eficientes que puedan mejorar la calidad de vida de aquellos pacientes en los que el resto de opciones terapéuticas no son posibles.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el envejecimiento de la población y la mayor esperanza de vida, hace que las donaciones de calidad disminuyan (cada vez las córneas son más viejas), y que se necesiten más (cuanto mayor esperanza de vida, más posibilidades de necesitar un trasplante). A esto hay que añadir que el aumento de la cirugía refractiva puede agravar estas carencias en los próximos años, ya que las córneas tratadas con láser no son, hasta la fecha, consideradas aptas para trasplante. Estos problemas de accesibilidad y suministro ponen de manifiesto la necesidad de creación de una córnea artificial que pueda sustituir en el futuro a la córnea natural procedente de donante cadáver.

### **3. La cicatrización y regeneración del estroma corneal:**

La recuperación de una lesión en el estroma corneal ocurre lentamente,

presumiblemente porque se trata de un tejido avascular, los queratocitos (su célula fundamental) son células muy especializadas con poca capacidad de proliferación, y la frecuencia de recambio de la matriz extracelular además de lenta decrece con la edad. El tejido que conforma la cicatriz resultante es más débil que el estroma original, lo cual se refleja en las dehiscencias traumáticas de las cicatrices de las queratoplastias penetrantes realizadas muchos años atrás (Nishida y cols., 2011).

En la regeneración de las heridas estromales existen tres fases básicas (Waring III y cols., 2011):

- Fase de destrucción: supone la eliminación del tejido anómalo por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos, ayudados por colagenasas y proteoglicanasas secretadas por las células epiteliales, fibroblastos y células inflamatorias. Si la fase de destrucción no se controla, el estroma corneal se funde (melting), conduciendo a la perforación corneal (Hsu y cols., 2003).
- Fase de síntesis: implica el cierre de la herida mediante la síntesis de nuevos colágenos y proteoglicanos por parte de los miofibroblastos y fibroblastos estromales derivados de los queratocitos tras un proceso de transdiferenciación. Esta fase se encuentra regulada por las células epiteliales mediante la secreción de factores paracrinos (ver más adelante). Si esta fase se ve inhibida por drogas (ej.corticoides) o enfermedades (ej.artritis reumatoide), la curación se retrasa y la resistencia de la herida se ve disminuida. En cambio, si esta fase de síntesis es excesiva, puede conducir a la formación de cicatrices que mermen las capacidades ópticas de la córnea.
- Fase de remodelado: el nuevo material sintetizado se ensambla formando una cicatriz que más adelante se va remodelando lentamente para generar un tejido más transparente, al obtener una estructura tisular más parecida a la córnea normal. No obstante, este tejido nunca obtendrá la misma configuración que la córnea original,

por lo que persistirán defectos en mayor o menor grado en la transparencia y resistencia de la zona lesionada. La interrupción de esta fase conduce a la persistencia de mayores cicatrices.

Durante las primeras horas de regeneración del estroma corneal anterior suceden los siguientes acontecimientos: oclusión del defecto por un coágulo de fibrina, el fluido procedente de la lágrima y el humor acuoso producen una hidratación del estroma adyacente, los PMNs migran desde la lágrima hacia el interior de la herida, los queratocitos de los bordes de la herida mueren, y el epitelio migra hacia la zona dañada.

La interacción epitelio-estroma es muy importante en la regeneración del daño corneal. El epitelio en fase de regeneración produce y secreta citoquinas (como la interleuquina IL-1, y el factor de crecimiento tisular TGF- $\beta$ ), las cuales estimulan a los queratocitos estromales para que se transdiferencien en fibroblastos y miofibroblastos y para que secreten matriz extracelular. Esta respuesta se observa tras la queratectomía fotorrefractiva con láser excimer, donde el epitelio regenerativo se encuentra en contacto directo con el estroma subyacente (Kremer y cols., 1999). Sin embargo, el mismo procedimiento realizado bajo un flap de córnea anterior que conserva el epitelio (LASIK) no induce la formación de un haze difuso (Dawson y cols., 2005), presumiblemente porque la ausencia de interacción entre el epitelio y el estroma conduce a una mínima activación de los queratocitos estromales, excepto en los bordes del flap, donde dicha interacción sí se produce conduciendo a la formación de una cicatriz lineal (Meltendorf y cols., 2009). Esta es la razón por la cual el estroma se mantiene transparente tras la creación de bolsillos (pockets) intraestromales para la implantación de anillos y lenticulos refractivos (como el Intracor para el tratamiento de la presbicia) (Ruiz y cols., 2009) y tras las heridas generadas por la aplicación de láser femtosegundo intraestromal (como durante la creación de un lenticulo intraestromal que posteriormente se extrae con fines refractivos). La falta de estimulación de los queratocitos estromales y por tanto la ausencia de

síntesis de citoquinas profibróticas como el TGF- $\beta$ 1 explican la ausencia de cicatrices en estos procedimientos. De hecho, se ha observado que en modelos de quemadura química corneal en ratón, el bloqueo de la señalización del TGF- $\beta$  reducía eficazmente la reacción fibrogénica y en consecuencia la cicatrización y opacificación corneal (Saika y cols.,2004; Saika y cols.,2008).

La citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) también interviene en la respuesta estromal al daño (Hong y cols., 2001), aunque su papel todavía no está del todo aclarado. Ratones knock-out para el TNF- $\alpha$  mostraron una exacerbación de la reacción inflamatoria tras quemadura química corneal, sugiriendo que el papel concreto de esta citoquina en la córnea puede variar en función de la condición específica (Saika y cols., 2006).

Dos de los procesos patológicos más frecuentes y no específicos que opacifican el estroma corneal son la fibrosis (cicatrización) y la vascularización (Waring III y cols., 2011):

**Fibrosis estromal:** Las modificaciones del alineamiento regular de las fibras de colágeno mayores de 20nm de distancia conducen a la dispersión de la luz, que clínicamente se manifiestan en forma de opacidad estromal. En consecuencia el paciente experimenta deslumbramiento y pérdida de visión. Esta opacidad se puede clasificar como nébula (nubosidad leve y difusa), mácula (mancha moderadamente densa) y leucoma (opacidad marcada blanca). La severidad, duración y extensión del daño determinan el grado de cicatrización corneal.

**Vascularización estromal:** Los vasos estromales pueden reducir la visión por tres vías: 1) distorsión de la arquitectura estromal normal; 2) fuga de lípidos desde los vasos hacia el estroma; 3) incremento del riesgo de rechazo de los trasplantes de córnea. Por estas razones casi siempre se intenta prevenir la vascularización corneal con el objetivo de conservar la visión. Sin embargo, en ocasiones (por ej. melting estromal) el crecimiento de estos vasos es

deseable, porque ayudan a prevenir la perforación corneal al facilitar el transporte de nutrientes, factores antimicrobianos, factores inmunomoduladores, antiproteasas y fibroblastos a la zona dañada del estroma. Los vasos estromales crecen siguiendo los planos generados por las lamelas de colágeno (no siguiendo el eje antero-posterior excepto que haya una cicatriz preexistente con esta morfología), y pueden crecer a tres niveles: 1) Vasos subepiteliales y en estroma superficial, secundarios a enfermedades de la superficie corneal (ej. portadores de lentes de contacto); 2) Vasos en las capas medias del estroma, secundarios a inflamaciones crónicas; 3) Vasos en las capas profundas del estroma pre-Desceméticas, secundarios normalmente a queratouveítis. Los principales factores de crecimiento implicados en la neovascularización corneal son el VEGF (vascular endothelial growth factor) y el TGF- $\beta$ . La localización y severidad de la inflamación corneal determinan la distribución y número de vasos estromales.

#### 4. Las células troncales mesenquimales: su carácter pluripotencial:

##### 4.1 La célula madre: conceptos básicos:

Se define a la célula madre como aquella que posee la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en distintos linajes celulares (Weissman, 2000).

Todas las células del organismo provienen de una sola célula, el óvulo fecundado. En los primeros estadios, el óvulo fecundado (totipotente) comienza a dividirse, dando lugar a células indiferenciadas, los blastómeros, que aunque carecen de función específica, poseen la capacidad intacta para poder formar cualquier tejido u órgano del individuo a excepción de las

cubiertas embrionarias. Por ello, a estas células se las conoce como "**pluripotentes**" o "**células madre embrionarias**" (embryonic stem cells o ESC).

No obstante, las células madre no son exclusivas de los organismos en desarrollo, pues también se encuentran presentes en los organismos adultos, y se las conoce como "**células madre adultas**". La diferencia principal de estas células con las ESC es que su grado de autorenovación y potencial de diferenciación es más limitado, por eso se las conoce también como "**multipotentes**". Las células madre adultas mejor caracterizadas son las células madre *hematopoyéticas*, capaces de proliferar y diferenciarse en todas las estirpes celulares sanguíneas, así como de regenerar el sistema hematopoyético completo en animales tras una mieloablación (Bhatia y cols., 1997; Osawa y cols., 1996; Spangrude y cols., 1988). También se han identificado células madre adultas *neurales* (McKay,1997) , *mesenquimales* (Fridenshtein, 1982; Pittenger y cols., 1999; Prockop, 1997), y *epidérmicas* (Watt, 2001), entre muchas otras.

Dentro del grupo de las células madre adultas, también se incluyen células progenitoras determinadas a un solo tipo celular (**unipotentes**), las cuales poseen una amplia capacidad de autorenovación pero en cambio no son capaces de diferenciarse a un tejido distinto del que provienen. Es el caso de las células madre epiteliales corneales (Daniels y cols., 2001) o de las espermatogonias testiculares (Russell y Brinster, 1996).

## 4.2 Aplicaciones básicas de las células madre:

Tradicionalmente, el concepto de trasplante de órganos y tejidos supone que el órgano trasplantado proviene íntegramente y sin modificar de un donante. El propósito de la ingeniería celular y tisular es generar nuevos tejidos funcionales capaces de reemplazar a aquéllos que han perdido su función, han resultado dañados o han muerto. La utilidad de las células madre con este fin ya ha sido demostrada en diversos campos de la medicina

regenerativa, como es el caso de las enfermedades hematopoyéticas, óseas, cutáneas o neurodegenerativas. Dado que el trasplante corneal es probablemente el procedimiento de trasplante más frecuentemente realizado en medicina, este tejido también debe beneficiarse de todos los avances que en la actualidad se están produciendo en el campo de la bioingeniería.

Por tanto, la principal aplicación clínica de las células madre en este ámbito radica en su utilidad para reemplazar células mediante el trasplante.

### 4.3 Tipos de células madre corneales:

En el organismo adulto, el recambio y la regeneración tisular dependen de las células madre presentes en cada tejido, y el ojo no resulta ninguna excepción:

- Células madre epiteliales corneales:

Se localizan en la región limbal basal, y se encargan de la regeneración y homeostasis del epitelio corneal (Thoft., 1983; Schermer y cols., 1986; Cotsarelis y cols., 1989).

- Células madre estromales corneales:

Como ya se ha comentado, se ha demostrado recientemente la presencia de escasas células madre mesenquimales localizadas en el estroma limbar anterior, similares a las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, con capacidad de diferenciación hacia queratocitos funcionales demostrada “in vitro” e “in vivo” mediante la producción de queratocán y ALDH (aldehído deshidrogenasa) (Dravida y cols., 2005; Du y cols., 2005; Polisetty y cols., 2008). Se cree que estas células son importantes en la regulación fisiológica del epitelio corneal por su proximidad anatómica con las células madre epiteliales limbares, pero se desconoce su papel real sobre el estroma corneal.



- Células madre endoteliales corneales:

En 2005 se demostró, por primera vez, la existencia de precursores endoteliales en el endotelio corneal humano (Whikehart y cols., 2005), los cuales se encontraban adyacentes a la periferia endotelial en el área limbar. Además se observó que tanto la córnea central como periférica contenían estos precursores endoteliales, aunque éstos eran más abundantes en la córnea periférica (Mimura y cols., 2005).

#### 4.4 La célula madre adulta: transdiferenciación:

Las estructuras oculares son una fuente limitada de células madre: se requiere el ojo contralateral sano para un trasplante autólogo, son de difícil obtención sin dañar el tejido donante, hay una baja cantidad de células madre en el tejido, son de difícil subcultivo, etc. La escasa eficiencia de los métodos actuales de obtención de células madre corneales motivó la idea de buscar células madre adultas extraoculares, cuya obtención fuese sencilla y eficiente, que pudieran aplicarse en el tratamiento de la patología oftalmológica con carácter autólogo.

Inicialmente se pensaba que las células madre adultas tenían el potencial de diferenciación restringido hacia el tipo celular del órgano original del que eran extraídas. Sin embargo, en los últimos años, numerosos estudios han demostrado que estas células, bajo las condiciones apropiadas, pueden originar otros tipos celulares diferentes a los del órgano origen, mediante un proceso conocido como "**transdiferenciación**". De esta manera se ha demostrado que las células madre mesenquimales de médula ósea pueden dar lugar a miocitos, hepatocitos o astrocitos (Woodbury y cols., 2000; Schwartz y cols., 2002), o que las células madre neurales pueden originar células sanguíneas y musculares esqueléticas (Almeida-Porada y cols., 2005).

Durante la aplicación clínica de la terapia celular con células madre adultas, es imprescindible conocer los medios de inducción adecuados para conseguir la transdiferenciación de la célula

madre a cada una de las estirpes específicas. El problema reside en que el conocimiento actual en este campo está limitado a unas pocas estirpes celulares. Existe evidencia de que el tejido receptor puede dirigir, en algunos casos, el proceso de diferenciación de las células trasplantadas hacia la estirpe deseada. Así, cuando las células madre neurales han sido usadas para formar músculo, el mero hecho de co-cultivarlas con mioblastos o inyectarlas directamente en músculo produce la transdiferenciación de las primeras a la estirpe deseada (Galli y cols., 2000). En el mismo sentido, la inyección de células madre mesenquimales en el interior del estroma corneal de conejos, induce su transdiferenciación hacia queratocitos estromales (Arnalich y cols., 2008).

Esto sugiere la posibilidad de que el trasplante directo de las células madre adultas en el tejido defectuoso, puede inducir su diferenciación hacia el tipo celular del tejido lesionado, sin que sea por tanto estrictamente necesario realizar esta transdiferenciación in vitro previamente al trasplante.

#### **4.5 Las células madre mesenquimales adultas:**

En la médula ósea, tejido derivado del mesoderma embrionario, se han identificado no solo “células madre hematopoyéticas” (HMC), sino también otro tipo de células madre derivadas del estroma, las “células madre mesenquimales” (MSC) (Friedenstein y cols., 1968; Fridenstein., 1982; Caplan.,1991; Paul y cols., 1991). Las MSC adultas han podido ser también aisladas en otros tejidos como el tejido adiposo (Gronthos y cols., 2001) , el músculo (Howell y cols., 2003) , el pericondrio (Arai y cols., 2002), los dientes deciduales (Miura y cols., 2003) y el estroma corneal (Dravida y cols., 2005; Du y cols., 2005; Polisetty y cols., 2008).

Las MSC derivadas del estroma de la médula ósea han demostrado su capacidad de diferenciación en distintos linajes de células mesodérmicas como los adipocitos, condrocitos,

mioblastos u osteoblastos (Grigoriadis y cols., 1988; Ferrari y cols., 1998; Johnstone y cols., 1998; Pittenger y cols., 1999). También son capaces de diferenciarse en derivados del neuroectodermo (Woodbury y cols., 2000) y del endodermo (Schwartz y cols., 2002). Por todo ello, este tipo celular representa una herramienta terapéutica muy prometedora en el campo de la regeneración tisular.

Sin embargo, existen varios inconvenientes en el uso de las MSC extraídas de la médula ósea: 1) El método para obtener el tejido es doloroso y requiere anestesia general o epidural; 2) El rendimiento obtenido es bajo tras el procesamiento de la médula (1 MSC por cada  $10^5$  células estromales adherentes obtenidas) (Gronthos y cols., 2001); 3) Por ello requieren antes de su aplicación una expansión celular ex vivo, lo cual retrasa, encarece y dificulta el proceso, además de incrementar el riesgo de contaminación durante el procedimiento.

Por tanto, el tejido ideal a utilizar como fuente de células madre adultas debería cumplir las siguientes características: 1) Fácil obtención mediante procedimientos poco iatrogénicos; 2) Proporcionar un número suficiente de células madre tras su procesamiento para no tener que someter a éstas a procesos de expansión excesivamente largos; 3) Tener la capacidad de generar células con posibilidad de diferenciación múltiple semejante a las MSC de médula ósea.

El tejido adiposo humano es una fuente ideal de MSC, ya que cumple todos los requisitos anteriores: fácil accesibilidad al tejido, alto rendimiento celular y capacidad de diferenciación de sus MSC en múltiples estirpes celulares. Múltiples estudios han demostrado la capacidad de diferenciación de estas células, la cual es similar a la ya descrita para las MSC derivadas de la médula ósea: mioblastos adipocitos, osteoblastos, condroblastos, neuronas, hepatocitos y células epiteliales entre otras (Zuk y cols., 2001; Zuk y cols., 2002; Gimble y Guilak., 2003; Ogawa y cols., 2004; Brzoska y cols., 2005; Seo y cols., 2005).

#### 4.6 Las células madre mesenquimales adultas derivadas del tejido adiposo (ADASC):

Un simple acto quirúrgico (acceso al tejido adiposo subcutáneo), y procedimientos poco complicados de aislamiento celular basados en la digestión enzimática, hacen que las ADASC (*adipose derived adult stem cells*) sean muy atractivas para los clínicos e investigadores. Con la incidencia cada vez mayor de obesidad en el mundo, el tejido adiposo subcutáneo se ha convertido en una fuente rica en células madre fácilmente accesible mediante los lipoaspirados y con una tasa de complicaciones menor del 0,1%. Se estima que hasta el 1% de las células del tejido adiposo son ADASC, en comparación con el 0,001% de MSC de las células que se encuentran en la médula ósea. Además las ADASC son más fáciles de cultivar y crecen más rápido que las derivadas de la médula ósea. Teniendo en cuenta la seguridad y popularidad de la liposucción en la actualidad, el lipoaspirado parece ser una prometedora fuente de células madre para uso clínico.

Las ADASC, por su amplia disponibilidad, permiten su uso tanto autólogo (con ventajas teóricas desde el punto de vista regulatorio y de histocompatibilidad) como alogénico. El trasplante alogénico de estas células abre un amplio abanico de posibilidades puesto que estudios independientes de tres laboratorios diferentes han determinado que las ADASC humanas cultivadas reducen la expresión de sus antígenos de histocompatibilidad de superficie, y no estimulan reacciones linfocitarias mixtas cuando se co-cultivan con los monocitos de la sangre periférica alogénica (De Miguel y cols., 2012). La confirmación definitiva de estos hallazgos tendría un profundo impacto en la aplicación de estas células, pues permitiría la creación de bancos celulares para su uso inmediato en el momento de una intervención, sin la necesidad de limitar su uso a procedimientos electivos para poder disponer de células autólogas.

Estas células madre poseen diversas formas de actuación terapéutica, hasta ahora se han descrito cuatro:

### **A) Regeneración tisular directa**

Es la más conocida y comprensible. Implica que las células madre se diferencien en células del tejido dañado, sustituyendo de esta forma a las que no sirven y reparando el órgano a tratar. Las ADASC han mostrado potencial para diferenciarse en células y órganos de origen mesodérmico fundamentalmente, pero cada vez hay más evidencia sobre la capacidad de estas células para diferenciarse en otras de origen no mesodérmico (como neuronas, hepatocitos, células endoteliales, células pancreáticas endocrinas, etc). Por esta razón, las posibles aplicaciones terapéuticas de estas células son muy numerosas, y se trata de una línea de investigación muy fuerte en la actualidad en todo el mundo. Aunque ya se han publicado unos pocos estudios en pacientes humanos, la gran mayoría de la investigación en este campo se ha realizado, hasta la fecha, en cultivos celulares *in vitro* y en modelos animales de experimentación:

- Generación de hueso: como en la reparación de tejido óseo craneal (Yoon y cols., 2007).
- Generación de cartílago (Ogawa y cols., 2004).
- Diabetes Mellitus (Vanikar y cols., 2010).
- Esclerosis Múltiple (Karussis y cols., 2010; ensayos clínicos en fase I/II).
- Fístulas anales secundarias a enfermedad de Crohn (García-Olmo y cols., 2009; ensayos clínicos en fase II).

- Enfermedades cardíacas: su aplicación tras un infarto de miocardio produce una reducción del tejido necrótico en los animales de experimentación, mayormente por inducción angiogénica (Planat-Benard y cols., 2004).
- Enfermedades hepáticas: en modelos de hepatectomía parcial y cirrosis hepática se ha observado anidamiento de estas células. Los resultados fueron mejores cuando se inyectaron células previamente diferenciadas in vitro hacia hepatocitos (Banas y cols., 2007; Aurich y cols., 2009).
- Incontinencia urinaria (Jack y cols., 2005).
- Enfermedades corneales: su trasplante en bolsillos intraestromales, de conejo, ha demostrado la facultad de estas células de sobrevivir en la córnea sin provocar rechazo y de diferenciarse en queratocitos funcionales, siendo capaces de regenerar parcialmente la córnea dañada (Arnalich-Montiel y cols., 2008; De Miguel y cols., 2010; Espandar y cols., 2012).

### **B) Regeneración tisular indirecta: ADASC como biorreactores**

Además de su capacidad de servir como células estructurales cuando se diferencian en las células del tejido dañado, las MSC son capaces de modular el tejido por medio de la secreción de un amplio espectro de moléculas bioactivas con carácter paracrino, promoviendo la regeneración tisular mediante la activación de las células propias del tejido dañado (Phinney y cols., 2007). La expresión de estos factores paracrinos induce una gran variedad de respuestas: promoción de la supervivencia y proliferación de los progenitores celulares y otros tipos celulares más diferenciados propios del tejido (Prockop y cols., 2002); inducción de angiogénesis (Shyu y cols., 2006); reducción de la apoptosis (Hung y cols., 2007); e inhibición de la respuesta inflamatoria e inmune (ver más abajo).

Las ADASC también pueden ser modificadas genéticamente para producir otros factores paracrinos diferentes a los que producen de forma natural. Es el caso de las citoquinas MDA-7 y PEDF sobre expresadas en ADASC para su uso como terapia anticancerígena en el cáncer de próstata, aprovechando la capacidad innata de estas células de migrar hacia el lugar del tumor (Zolochévka y cols., 2012). Del mismo modo se han empleado las ADASC para inhibir el glioblastoma cerebral mediante la sobreexpresión de una citosindeaminasa (Altanérova y cols., 2011).

### **C) Reclutamiento de progenitores celulares:**

Varias moléculas secretadas por las ADASC son responsables del reclutamiento de nuevos progenitores celulares hacia el lugar del daño tisular.

En regeneración cardíaca tras infarto de miocardio, se ha demostrado que las ADASC son beneficiosas por el reclutamiento de células progenitoras del músculo cardíaco, que anidan en el miocardio isquémico contribuyendo a su regeneración (Sanz-Ruiz y cols., 2008; Hong y cols., 2010).

### **D) Inmunomodulación:**

Las ADASC han demostrado tener unas cualidades inmunomoduladoras similares a las ya observadas con las MSC provenientes de médula ósea. Se ha comprobado que las ADASC no provocan alorreactividad in vitro contra linfocitos incompatibles, a la vez que suprimen la respuesta linfocitaria funcional y proliferativa frente a mitógenos (Puissant y cols., 2005), e incluso suprimen la diferenciación de las células dendríticas (Ivanova-Todorova y cols., 2009). Esta inhibición de la respuesta linfocitaria es estrictamente local, lo que sitúa a las MSC-ADASC como un candidato idóneo en la regulación de la respuesta inmune tras el trasplante alogénico (De Miguel y cols., 2012).

La eficacia de las MSC como moduladoras del sistema inmune ha sido ampliamente demostrada. Actualmente existen dos líneas de investigación: 1) MSC como supresoras de la respuesta inmune en enfermedades inflamatorias o autoinmunes; 2) MSC como prevención y tratamiento del rechazo en individuos trasplantados (De Miguel y cols., 2012).

Se ha probado la eficacia inmunomoduladora de las ADASC en escenarios singénicos, alogénicos e incluso xenogénicos, así como en gran variedad de patologías como: encefalomiелitis autoinmune (Constantin y cols., 2009), colitis ulcerosa (González-Rey y cols., 2009), hipoacusia autoinmune (Zhou y cols., 2011), enfermedad de Crohn (Duijvestein y cols., 2010), lupus (Liang y cols., 2010), esclerosis múltiple (Karussis y cols., 2010), etc. Se demostró que, mediante la infusión sistémica de ADASC en un modelo de ratón para esclerosis múltiple, éstas podían anidar en los ganglios linfáticos y el cerebro, suprimiendo la respuesta autoinmune en fases tempranas de la enfermedad, así como induciendo neurorregeneración local mediante progenitores endógenos (Constantin y cols., 2009).

Por tanto, la terapia con MSC/ADASC es capaz de mejorar los síntomas de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias en pacientes donde la terapia convencional inmunosupresora no es eficaz. Éste efecto se conseguiría mediante la disminución de la infiltración por linfocitos T citotóxicos (y por tanto disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias) en el tejido afectado, así como el aumento de linfocitos T reguladores (con mayor producción de citoquinas antiinflamatorias) (De Miguel y cols., 2012).

Uno de los campos en el que los ensayos clínicos están más avanzados es en la prevención y tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped. Pacientes que no responden a terapias inmunosupresoras convencionales, han mostrado resultados muy positivos mediante la administración de MSC o ADASC, consiguiendo en algunos casos la remisión completa de la enfermedad (Puissant y cols., 2005; Fang y cols., 2006 y 2007).



En individuos trasplantados, la administración sistémica de MSCs (procedentes del donante) previa al trasplante, ha demostrado ser de gran utilidad a la hora de aumentar la supervivencia del trasplante. Los ensayos clínicos con pacientes están todavía en los primeros estadios.

Las ADASC, gracias a todas estas propiedades inmunomoduladoras, podrían suponer en el futuro una poderosa herramienta para generar modelos de trasplante de córnea con nulo o muy bajo riesgo de rechazo.

## **5. Aplicaciones de las células troncales de origen adiposo en la regeneración corneal:**

Aunque en otros campos de la medicina ya se han realizado ensayos clínicos con pacientes empleando estas células para su uso terapéutico (como es el caso de la enfermedad “injerto contra huésped” o las fístulas anales de la enfermedad de Crohn), en el campo de la oftalmología todos los estudios publicados hasta la fecha en relación a la aplicación terapéutica de las ADASC siguen en fase de experimentación animal.

### **5.1 Aplicaciones en la regeneración del epitelio corneal:**

#### **5.1.1 Contexto actual de la regeneración del epitelio corneal con células madre-no ADASC**

La terapia celular más extendida actualmente para la regeneración del epitelio corneal es el trasplante de células madre epiteliales limbares (limbal epithelial stem cells-LESC) cultivadas y expandidas *ex vivo*, con aplicación principalmente autóloga. Aunque el aloinjerto de LESC es una posible opción terapéutica para aquellos pacientes con una insuficiencia limbar completa bilateral, esta técnica exige inmunosupresión oral y no está exenta de

complicaciones, siendo el rechazo la más importante. Por ello es muy importante para este tipo de pacientes encontrar una fuente extraocular de células madre autólogas que nos permitan la reconstrucción de la superficie ocular.

Se han ensayado injertos de células epiteliales autólogas de mucosa oral, con buenos resultados en la reconstrucción de la superficie ocular, pero con una relativamente alta tasa de neovascularización corneal periférica (Nakamura y cols.,2004; Nishida y cols.,2004; Hayashida y cols., 2005; Inatomi y cols., 2005). También se han ensayado injertos de células madre adultas epidérmicas de la oreja de la cabra, con problemas en la obtención de una transparencia corneal adecuada (Yang y cols., 2008). Estudios recientes han empezado a ensayar las MSC derivadas de la médula ósea como posible fuente celular para la reconstrucción de la superficie corneal, obteniendo unos resultados equiparables a los obtenidos con las LESC en lo que respecta a epitelización corneal y agudeza visual final. En estos estudio no pudieron demostrar que las MSC expresasen marcadores epiteliales corneales como la CK3, por lo que parece que hubo una falta de diferenciación de las MSC hacia células epiteliales corneales (Ma y cols., 2006; Gu y cols., 2009).

### **5.1.2 Regeneración del epitelio corneal con células madre ADASC**

En un reciente estudio se ha demostrado que las ADASC expresan, además de los marcadores propios de células madre, citoqueratinas (CK12 y CK76) de manera progresiva y ascendente mediante selección de adhesión celular en los medios de cultivo. La presencia de citoqueratinas se considera característica de diferenciación hacia células epiteliales. Por tanto los autores concluyen que las ADASC son capaces de adquirir características epiteliales bajo las condiciones adecuadas, teniendo entonces potencial para su aplicación en la regeneración de la superficie corneal (Martínez-Conesa y cols., 2012).

La única publicación hasta la fecha en la que ensayan ADASC para la reconstrucción de la superficie corneal en humanos es un caso clínico aislado, publicado recientemente, en el que

obtienen la curación de una úlcera neurotrófica refractaria al tratamiento convencional tras la aplicación tópica de un agregado de ADASC autólogas. Se requieren ensayos clínicos más rigurosos para la confirmación de dichos resultados (Agorogiannis y cols., 2012).

## 5.2 Aplicaciones en la regeneración del estroma corneal:

La expansión *ex vivo* de los queratocitos, las células del estroma corneal, es un proceso factible (Germain y cols., 1999; Webb y cols., 2003; Hu y cols., 2005; Alaminos y cols., 2006). También se ha propuesto la posibilidad de producir estroma a partir de la célula madre estromal, ya caracterizada (Du y cols., 2007). A pesar de estos avances, hay que tener en cuenta que la obtención de grandes cantidades de estas células mediante el subcultivo es muy difícil. Además los queratocitos no son ni numerosos, ni fáciles de extraer sin dañar la córnea donante, lo que hace difícilmente factible la idea de poder realizar un trasplante autólogo de queratocitos cultivados. Se requiere por tanto una fuente extraocular de células madre autólogas.

### 5.2.1 **Transdiferenciación de ADASC a queratocitos *in vitro***

Un estudio reciente demuestra que las ADASC son capaces de expresar marcadores específicos de diferenciación queratocítica (queratocán, queratán sulfato y aldehído deshidrogenasa 3 familiar-ALDH3A1) cuando se emplean las mismas condiciones de cultivo utilizadas para la diferenciación de las células madre estromales corneales en queratocitos. Esta diferenciación queratocítica de las ADASC *in vitro* permitiría su aplicación en la terapia celular corneal (Du y cols., 2010).

### 5.2.2 **Transdiferenciación de ADASC a queratocitos *in vivo***

Hasta la fecha, únicamente se han publicado dos estudios en los que se emplean

células de origen extraocular con el objetivo de regenerar el estroma corneal. Ambos se centran en el empleo de las ADASC para ello. Establecieron las bases sobre las que se construye el actual estudio que estamos presentando.

En 2008, en el marco de nuestro grupo de investigación, Arnalich y colaboradores emplearon un modelo experimental de daño corneal en conejo, en el que separaban un colgajo estromal para posteriormente realizar una ablación de 50 $\mu$ m de espesor en el seno del estroma. Una vez realizado este bolsillo intraestromal, introdujeron una suspensión de ADASC en el interior del mismo, sin biomaterial alguno acompañante. Tras el sacrificio de los animales al tercer mes de observación, demostraron que las ADASC trasplantadas en el estroma:

- Adquieren una morfología similar a los queratocitos: forma estrellada y dispersas entre las lamelas de colágeno.
- Se diferencian en queratocitos funcionales: demostrado mediante la expresión de marcadores de queratocitos, como el queratocán y la ALDH, por estas células.
- Se comportan como queratocitos: producción de colágenos I y VI.
- Sobreviven más de 12 semanas tras el trasplante, manteniendo su morfología sin alterar la configuración histológica del estroma.
- No migran del plano en el que fueron originalmente colocadas.
- No desencadenan ninguna respuesta inflamatoria ni forma de rechazo a pesar de tratarse de un xenotrasplante en animales inmunocompetentes, preservando la transparencia corneal en consecuencia.

Concluyeron que las ADASC pueden ser una fuente celular útil para la regeneración estromal en córneas enfermas (Arnalich y cols., 2008).

Recientemente se publicó otro estudio en el que se realizaba un procedimiento similar, pero ensayando si la introducción de diferentes tipos de matrices extracelulares sintéticas derivadas del ácido hialurónico (HA) junto con las ADASC, fomentaban la proliferación y diferenciación de estas células. Obtuvieron unos resultados similares al anterior estudio, con supervivencia celular adecuada y diferenciación hacia queratocitos funcionales por parte de las ADASC, pero refiriendo que con uno de los hidrogeles de HA que ensayaron se observó mayor supervivencia y diferenciación que con la inyección de ADASC aislada sin vehículo específico. En base a estos hallazgos, concluyeron que las ADASC asociadas a un vehículo derivado del HA podrían ser usados como fuente de queratocitos para la regeneración estromal (Espandar y cols., 2012).

### 5.3 Aplicaciones en la regeneración del endotelio corneal:

Los estudios sobre terapia celular aplicada al endotelio corneal que se han realizado hasta la fecha se han centrado en el empleo de las células madre endoteliales humanas. Los más recientes han trasplantado láminas de células endoteliales corneales humanas cultivadas sobre diferentes constructos a modo de DSAEK e inyectado esferas que contienen estas células en la cámara anterior ocular de modelos de conejo para insuficiencia endotelial, obteniendo una buena funcionalidad del injerto (Mimura y cols., 2013). El problema de estas técnicas es que requieren una gran cantidad de células endoteliales corneales, por lo que se hace imprescindible encontrar otra fuente diferente de precursores de células endoteliales.

Se ha observado que se puede inducir la diferenciación de las ADASC a células endoteliales (vasculares) *in vitro* e *in vivo* en modelos de isquemia en ratón, abriendo un nuevo y amplio campo de investigación en el tratamiento de la isquemia tisular mediante la inducción de neoangiogénesis (Miranville y cols., 2004., Cao y cols., 2005). Este hallazgo deja de manifiesto la posibilidad de que las ADASC, bajo una estimulación adecuada, pudieran también diferenciarse

en células endoteliales corneales, con su consecuente aplicación en la insuficiencia corneal de células endoteliales.

## 6. Avances en Bioingeniería Tisular corneal:

La **Bioingeniería Tisular** integra los principios de la Bioingeniería y la Terapia Celular hacia el desarrollo de sustitutos biológicos capaces de reemplazar el órgano o tejido en cuestión (Langer y Vacanti, 1993). Por tanto, es aquella disciplina que combina el empleo de biomateriales, factores de crecimiento y células madre con la finalidad última de reparar o regenerar órganos dañados o no funcionales.

Las dificultades inherentes al trasplante corneal (principalmente rechazo primario y escasez de suministro del órgano) han conducido al interés por el desarrollo de córneas artificiales que puedan sustituir al órgano natural. Estos sustitutos deben poder mimetizar las funciones más importantes de la córnea normal (refracción, transparencia y protección), para que de esta forma puedan reemplazar parcial o totalmente el espesor de una córnea dañada o enferma. Estos dispositivos van desde prótesis acelulares hasta complejos hidrogeles que permiten cierta regeneración del tejido del huésped.

La idea de una córnea artificial se originó en 1771 cuando Guillaume Pellier de Quegny sugirió el reemplazo de una córnea opaca por un cristal, aunque esta idea no se puso en práctica hasta 1853 cuando Nussbaum colocó un implante de cristal de cuarzo en el ojo de un conejo (Nussbaum., 1853).

La queratoprótesis ideal sería aquella que pueda ser implantada de una manera similar a la queratoplastia penetrante y cuya superficie pueda ser epitelizada (Carlsson y cols., 2003). La mayoría de los diseños actuales emplean un corazón flexible con propiedades ópticas (core),

en íntima unión a un tejido microporoso circundante (scaffold o skirt) que permite el crecimiento fibroblástico y el depósito de matriz extracelular, permitiendo así el anclaje e integración del complejo protésico a la córnea receptora. La superficie posterior debe prevenir la proliferación celular para así evitar el desarrollo de membranas retroprotésicas, y además la óptica debe ser permeable al oxígeno y nutrientes, para poder mantener entonces cualquier componente celular del dispositivo.

En los últimos años se han desarrollado nuevos y mejorados biomateriales, compatibles con la córnea humana, que han permitido la producción de avanzados scaffolds. Éstos han sido empleados para ensayar nuevos modelos de córnea artificial (queratoprótesis) con el objetivo de intentar resolver los problemas existentes con las opciones actuales. Entre los biomateriales más relevantes se encuentran: hidrogeles de poli-hidroxietil metacrilato (Hicks y cols., 1997 ; Lou y cols., 1999), hidrogeles de colágeno y condroitín sulfato (Griffith y cols.,1999 ; Orwin y cols., 2003), goma de silicona recubierta de polivinilpirrolidona (Lee y cols., 1996 ; Legeais y cols., 1998), poliuretanos (Bruin y cols., 1993), y perfluoroéteres (Evans y cols., 2000); todo ello junto a multitud de modificaciones químicas que intentan promover la epitelización (Griffith y cols., 2002 ; Ruberti y cols., 2008).

A pesar de que se han propuesto multitud de modelos de queratoprótesis en los últimos años, sólo tres de ellos se implantan actualmente de manera significativa en América y Europa y, por tanto, pueden ser evaluados de manera independiente y fiable a partir de la literatura publicada: son la osteo-odonto-queratoprótesis (OOKP), la córnea artificial AlphaCor™, y la queratoprótesis de Boston (KPro™). A esta última también se la conoce como queratoprótesis de Dohlman-Doane. Las indicaciones médicas de cada uno de estos modelos difieren, en parte, debido a las diferentes propiedades anatómicas y potenciales debilidades de los biomateriales que las componen (Chodosh y cols., 2011).

<b>Modelo Queratoprótesis</b>	<b>Core (óptica central)</b>	<b>Skirt (andamiaje periférico)</b>
<b>OOKP</b>	Polimetil-metacrilato (PMMA)	Lámina osteo-dental autóloga
<b>Dohlman-Doane (Boston)</b>	PMMA	PMMA
<b>AlphaCor</b>	Poli-2-hidroxietil metacrilato (pHEMA) no poroso y transparente	pHEMA poroso y opaco

	<b>Dispositivo</b>	<b>Nº Implantes</b>	<b>Seguimiento</b>	<b>Pronóstico visual</b>	<b>Tasa conservación</b>
<b>Tan et al. (2012)</b>	OOKP	Metaanálisis (1950-2011)	67,3 meses (15,4-144)	>20/70 en 52% (media postop)	<b>87,8% (5 años)</b> <b>81% (20 años)</b>
<b>Hicks et al. (2006)</b>	AlphaCor™	322	15,5 meses (1-89)	20/200 (media postop)	<b>65,8% (2 años)</b>
<b>Jirásková et al. (2011)</b>	AlphaCor™	15	38 meses (12-67)		<b>87% (1 año)</b> <b>58% (2 años)</b> <b>42% (3 años)</b>
<b>Greiner et al. (2011)</b>	Boston Tipo 1	40	33,6 meses (5-72)	<u>≥20/200:</u> 50% (2,8 años)	<b>80% (2,8 años)</b>
<b>Aldave et al. (2012)</b>	Boston Tipo 1	113	14,2 meses (1-48)	<u>20/20 - 20/200:</u> 70% (6 meses) 68% (1 año) 59% (2 años)	<b>79,2% (1 año)</b> <b>74,6% (2 años)</b>
<b>Pujari et al. (2011)</b>	Boston Tipo 2	29	*	<u>≥20/200:</u> 57,1% (≥1 año) 46,2% (≥5 años)	<b>58,6%*</b>

**Tabla 1.-** Tipos de queratoprótesis: composición (arriba) y publicaciones más recientes (abajo).

\*Seguimiento total de 107,9 persona-años



### **Discusión de los modelos actuales de queratoprótesis:**

- **Osteo-odonto-queratoprótesis:**

Esta prótesis se compone de un cilindro óptico central de PMMA insertado en la raíz de un diente monoradicular junto con parte del hueso alveolar circundante del propio paciente. Su implantación se asocia a un injerto de mucosa oral sobre toda la superficie ocular. Se trata de una técnica quirúrgica muy compleja, de abordaje multidisciplinar, y que requiere dos o tres intervenciones independientes para su conclusión. Esto hace que esta técnica sea la más invasiva y técnicamente más difícil de todas las técnicas de queratoprótesis, además de ser la única irreversible y la que peores resultados cosméticos obtiene. Lógicamente, estos inconvenientes limitan mucho su aplicación, pero la buena integración del tejido óseo autólogo que compone su scaffold y la lubricación que aporta el injerto de mucosa oral hacen que esta técnica suponga prácticamente la única alternativa de garantías para aquellos casos asociados a un ojo seco severo, como ocurre en las conjuntivitis cicatriciales autoinmunes como el penfigoide ocular. No debería considerarse esta opción terapéutica en ningún paciente con visión funcional en el ojo contralateral (Strampelli., 1963; Falcinelli y cols., 2005; Tan y cols., 2012) (Figura 2A).

- **Cornea artificial AlphaCor™:**

Consiste en un dispositivo en forma de plato compuesto por pHEMA no poroso y transparente central, que ejerce de óptica, rodeado por un scaffold compuesto también de pHEMA pero opaco y poroso que facilite la infiltración de células estromales y vasos sanguíneos. Su implantación en un pocket intraestromal también requiere dos procedimientos quirúrgicos, pero se trata de una técnica más sencilla que la OOKP. El dispositivo es hidrofílico, por lo que es imprescindible una película lagrimal sana para su supervivencia. Esto hace que la principal indicación de esta técnica sea el rechazo corneal múltiple, sin otras patologías

asociadas (Chirila y cols., 1994; Hicks y cols., 2006). La principal limitación de esta técnicas supone la alta tasa de melting estromal asociado al implante (26,4%) que se produce (Jirásková y cols., 2011). En estudios histológicos se ha observado que en las áreas afectadas hay una biointegración reducida del scaffold a la córnea receptora junto con un infiltrado inflamatorio (Hicks y cols., 2005) (Figura 2B).

- **Queratoprótesis de Boston:**

La Tipo 1 consiste en dos platos de PMMA dispuestos a modo de “sándwich” alrededor de una córnea donante o la propia córnea del paciente. La tipo 2 es una variación para su implantación a través del párpado superior, técnica muy poco empleada reservada para aquellos pacientes con ojo seco severo asociado. La tipo 1 requiere una técnica quirúrgica sencilla para su implantación, similar a una queratoplastia penetrante, que se realiza en un solo acto quirúrgico. Esto unido a los mejores resultados obtenidos con las sucesivas optimizaciones del modelo así como las mejoras en el seguimiento postoperatorio hacen que este modelo de queratoprótesis sea, en la actualidad, el más empleado por la mayoría de los cirujanos (Dohlman y cols., 1974; Zerbe y cols., 2006). No obstante, sigue siendo una técnica quirúrgica con una elevada tasa de complicaciones (incidencia significativa de glaucoma), y una tasa de supervivencia del implante de en torno al 75% los dos primeros años (Aldave y cols., 2012). La pobre integración del PMMA con la córnea receptora ha promovido la investigación de posibles mejoras que favorezcan la biointegración de este material con el tejido circundante, como cubiertas de hidroxiapatita alrededor de los platos de PMMA, obteniendo un menor infiltrado inflamatorio alrededor del implante *in vivo* pero sin llegar a demostrar un mayor estímulo de la proliferación queratocítica (Wang y cols., 2011) (Figura 2C-D).

### **Principales complicaciones de los modelos actuales de queratoprótesis:**

#### 1. **OOKP:**

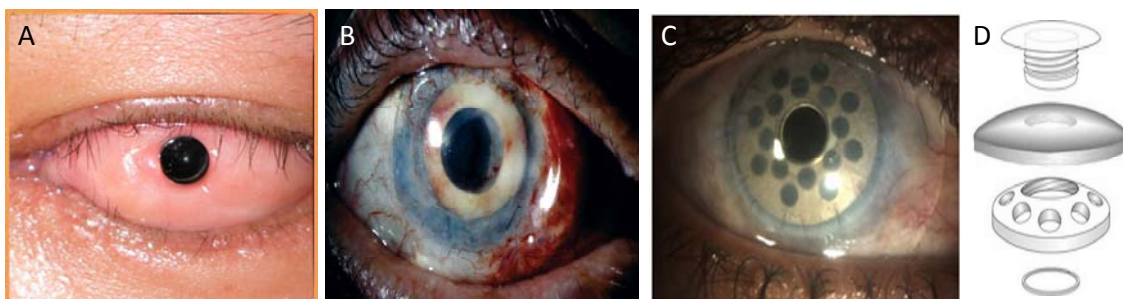
Glaucoma (7-47%), membrana retroprotésica (20%), reabsorción de la lámina ósea (2-43%), desprendimiento de retina (2-26%), endoftalmitis (2-8,3%). Otras complicaciones frecuentes son el crecimiento de la mucosa oral sobre la óptica (0-33%) y el adelgazamiento/ulceración de dicha mucosa (0-48%) (Tan y cols.,2012).

#### 2. **AlphaCor:**

Melting estromal (26,4%), cierre fibroso de la apertura lamelar posterior (13%), depósitos intraópticos (8,4%). El melting estromal asociado a este dispositivo supone una complicación grave, pues el 64,5% de estos casos requirieron la explantación del implante (Hicks y cols., 2006).

#### 3. **Dohlman-Doane:**

Membrana retroprotésica (25%), presión intraocular elevada (14,8%), vitritis (4,9%), desprendimiento de retina (3,5%) (Zerbe y cols., 2006).



**Figura 2.-** Ejemplos clínicos de los diferentes modelos de queratoprótesis (A: OOKP; B: Alphacor; C: Dohlman-Doane) y diseño esquemático de la queratoprótesis de Boston Tipo 1 (D)

Las queratoprótesis disponibles para la clínica en la actualidad todavía tienen grandes limitaciones, por esta razón sólo se emplean en el tratamiento de los pacientes de mayor riesgo cuando el resto de opciones ya no son viables. Esto pone de manifiesto la necesidad de continuar con la investigación en este campo y diseñar nuevos materiales y modelos que permitan expandir y simplificar estas técnicas.

La combinación de scaffolds junto con células supone el futuro de la ingeniería tisular corneal. Algunos estudios al respecto ya han sido publicados, en los cuales emplean diferentes líneas celulares corneales para la colonización de los scaffolds: células epiteliales (Dravida y cols., 2008), queratocitos estromales (Mimura y cols., 2008 ; Hu y cols., 2005), las tres capas celulares corneales (Griffith y cols., 1999 ; Vrana y cols., 2008). Se trata de estudios en su mayoría *in vitro* y unos pocos *in vivo* (empleando estos últimos células estromales y córneas de conejo). Aportan resultados positivos respecto a adhesión y supervivencia celular en los diferentes constructos, concluyendo sobre la posibilidad de, en un futuro, poder generar sustitutivos corneales completos *in vitro* que puedan aplicarse en la práctica clínica.

Otra aproximación a las prótesis estromales podría ser el empleo de estructuras naturales. Recientemente se han descrito varios procedimientos de descelularización corneal que permiten eliminar todo el componente celular dejando únicamente una matriz extracelular corneal acelular, la cual puede ser aplicada en el estudio de la regeneración corneal (Shao y cols., 2010; 2012). Para la obtención de láminas de matriz extracelular acelular de tejido corneal humano se consideran válidas las láminas que cumplan las siguientes condiciones (Crapo y cols., 2011):

- Tener una cantidad de ADN menor a 50 ng/mg de tejido.
- Tener una matriz extracelular conservada.
- Ser recolonizable en un ensayo *in vitro*.

Xu y colaboradores publicaron un estudio en el que ensayaron la biocompatibilidad de scaffolds compuestos de matriz corneal acelular porcina (no recelularizada) dentro del estroma corneal de conejo *in vitro*, obteniendo buenos resultados de biointegración, transparencia y ausencia de rechazo. También colonizaron estas láminas *in vitro* con los tres tipos de células corneales de conejo cultivadas, mostrando las mismas una buena adhesión al implante. No estudiaron la biocompatibilidad *in vivo* de estas láminas recelularizadas. El inconveniente de este estudio es que esta colonización no sería aplicable en el caso de células humanas, pues supondría el consumo de varias córneas donantes para obtener la cantidad suficiente de células para cultivo y además el endotelio corneal humano, a diferencia del de conejo, no es fácilmente cultivable. El seguimiento de los ensayos *in vivo* fue únicamente de un mes (Xu y cols., 2008).

En un estudio reciente, similar al anterior, realizaron ensayos *in vitro* colonizando láminas de matriz corneal acelular porcina con los tres tipos de células corneales pero en este caso de origen humano. Obtuvieron buenos resultados de adhesión y conservación de fenotipo celular pero no realizaron su ensayo en experimentos *in vivo*. El empleo de células corneales humanas tiene las limitaciones ya comentadas respecto a una posible aplicación clínica (Yoeruek y cols., 2012).

Hasta la fecha, que conozcamos, no hay estudios publicados que ensayen *in vivo* estos nuevos modelos de scaffold compuestos de cornea descelularizada con posterior recelularización empleando células humanas extraoculares, abriendo un campo nuevo y extenso de investigación.

# *Justificación e Hipótesis*

---

De acuerdo con lo expuesto hasta ahora, la regeneración corneal es una etapa esencial en la restitución de la normalidad anatómica en patologías debilitantes de causa endógena (distrofias y ectasias corneales) y de causa inducida (inflamaciones, traumatismos, iatrogenia, etc). La sustitución del tejido corneal por tejido autólogo o por células capaces de promoverlo resulta conceptualmente una solución ideal para reemplazar el tejido colágeno dañado, desaparecido o no correctamente formado. Para su adecuado desarrollo, se requieren células productoras de colágeno, las cuales inicialmente, deben encontrarse soportadas por una estructura no autóloga, que permita su soporte y posteriormente su integración a través de la producción de colágeno por parte de las células con las que previamente han sido colonizadas. Siendo así, sería conceptualmente posible implantar un biomaterial colonizado por células humanas, incluso del propio paciente, que podría integrarse a través de la producción de colágeno de estas células dentro de su propia estructura. Este material sería no sólo capaz de reintegrar la normalidad anatómica y estructural a las córneas debilitadas, sino que también supondría un material ideal para el soporte tectónico de elementos ópticos capaces de reemplazar la córnea y su funcionalidad óptica.

La presente tesis doctoral tiene por tanto, su punto de partida en este concepto general y busca el desarrollo de métodos de soporte de células autólogas del propio paciente de tipo troncal pluripotencial de origen no ocular, con el objetivo de promover su integración en la córnea receptora y servir con ello a los fines antes mencionados.

Nuestra hipótesis de trabajo es que es posible obtener la proliferación y producción de colágeno por parte de células madre humanas derivadas del tejido adiposo (ADASC), una vez que éstas han colonizado un biomaterial utilizado para su soporte, incluida la propia córnea humana descelularizada, y demostrar que esto ocurre y que es posible comprobarlo en un modelo experimental animal.

# *Objetivos*

---



Para la demostración de la hipótesis de trabajo, esta tesis se fundamenta en la consecución de los siguientes objetivos:

1. Desarrollo y prueba de distintos biomateriales macroporosos capaces de ser colonizados por células ADASC.
2. Desarrollar un protocolo de descelularización de córnea humana eficiente que permita eliminar todo el componente celular, conservando intacta su matriz extracelular y proporcione un tejido apto para su posterior colonización por células ADASC.
3. Implante de los soportes arriba mencionados (biomateriales orgánicos y córnea humana descelularizada), una vez colonizados por células ADASC, en la córnea de en un modelo experimental de conejo albino New Zealand para demostrar la biointegración y tolerancia de los mismos, así como la diferenciación de las células implantadas en queratocitos adultos funcionales.
4. En base a lo obtenido en los objetivos anteriores, llegar al desarrollo de un modelo final de elemento transportador de células ADASC para su implante en el ojo humano a efectos de promover la regeneración del tejido corneal, utilizando células autólogas del propio paciente implantado.

# *Material y Métodos*

---

## 7. Aspectos generales:

### 7.1 Descripción breve del proyecto:

El objetivo, como ya se ha comentado previamente, es evaluar la biocompatibilidad de diferentes biomateriales artificiales y naturales dentro del estroma corneal en un modelo animal in vivo, además de valorar si esta biointegración del material en el tejido circundante se ve favorecida o no por la adición a las prótesis de las *adipose derived adult stem cells* (ADASC) de origen humano, obtenidas a partir de la fracción celular del lipoaspirado procesado (LPA) resultante de la digestión enzimática de la grasa humana donante obtenida para el proyecto. Todos los tejidos humanos se manipularon cumpliendo con las directrices establecidas en el BOE para la utilización de células y tejidos humanos con fines experimentales (BOE n.126 de 27-5-2006, páginas 19947-19956).

Hemos estudiado dos tipos de biomateriales, uno artificial (compuesto de *poliacrilato de etilo*, PEA) y otro natural (compuesto de *estroma corneal humano descelularizado*). A modo de resumen se esquematizan a continuación las diferentes fases del proyecto:

#### A. Poliacrilato de etilo (PEA): 7 subtipos de biomateriales diferentes de inicio:

1. Estudios in vitro: análisis de la colonización celular de las prótesis con y sin diferentes recubrimientos. Selección del biomaterial más favorable.
2. Estudio in vivo con el biomaterial óptimo seleccionado: análisis de la biointegración tisular de la prótesis.

#### B. Estroma corneal humano descelularizado:

1. Estudios in vitro: análisis de la colonización celular de las prótesis.
2. Estudios in vivo: análisis de la biointegración tisular de las prótesis.

Todos los experimentos con animales fueron realizados por personal cualificado y en posesión de los correspondientes certificados que habilitan para la experimentación animal (*Categoría B* por parte del personal experimentador y *categoría C* por parte de los investigadores principales), y cumpliendo las normas de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) para la experimentación animal (*ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*). Las experiencias se realizaron con la aprobación, en todas las etapas que implicaban la manipulación de animales vivos, por parte del Comité Ético de Investigación Biomédica Experimental Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante).

## 7.2 Obtención de la población celular LPA: procesamiento del tejido adiposo humano:

El tejido adiposo subcutáneo se obtuvo de seis mujeres donantes sanas que se sometieron, por razones ajenas al estudio, a una liposucción electiva, por el facultativo Jorge Fernández-Delgado, previa obtención del consentimiento informado oral y escrito de las pacientes y tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz. Toda la muestra de tejido adiposo necesaria para el estudio se extrajo por liposucción intraoperatoria. Se descartó la infección activa por VIH, VHC y sífilis mediante los correspondientes análisis serológicos, siguiendo (como ya se ha comentado previamente) las directivas del BOE para la utilización de células y tejidos humanos con fines experimentales.

El lipoaspirado se procesó para obtener la *fracción vascular estromal* (FVS) siguiendo protocolos descritos previamente (Hauner y cols., 1987; Katz y cols., 1999; Zuk y cols., 2001).

De forma resumida:

1. La muestra de tejido adiposo (300cc) se dirigió a 37°C durante 30 minutos, en un volumen de 1:1 de solución colagenasa tipo I (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) disuelta al 0,075% en tampón fosfato salino (PBS).
2. La actividad de la colagenasa se neutralizó con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, y penicilina y estreptomycin al 1% (Gibco-BRL).
3. Tras la incubación, el tejido se centrifugó a 1.200 rpm (300 G) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, conteniendo gotas lipídicas y adipocitos maduros, dejando el pellet con la denominada fracción vascular estromal.
4. Se utilizó un tampón de NH<sub>4</sub>Cl 160 mM a fin de lisar los eritrocitos contaminantes de esta fracción durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. La FVS fue finalmente recogida por centrifugación en las mismas condiciones anteriores. Una vez separados los eritrocitos contaminantes, la FVS se sembró en placas Petri de 10 cm de diámetro (Corning, Corning, NY, USA) a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup>, manteniendo las células en cultivo en medio completo (DMEM con 10% FBS, piruvato sódico, glutamina y antibióticos) durante toda la noche en incubador a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>.
6. Transcurrido ese periodo, el cultivo fue lavado con PBS para eliminar las células no adheridas. La población celular restante, denominada lipoaspirado procesado (LPA, o PLA en inglés), se mantuvo en cultivo hasta alcanzar una sub-confluencia del 80-90% de la superficie de la placa. Durante este proceso se cambió el medio de cultivo tres veces por semana.

7. Una vez alcanzada la sub-confluencia, las células fueron sometidas a un proceso de congelación en medio apropiado (FBS con 10% DMSO, Sigma, San Louis, MS, USA), conservándose en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

### **7.3 Cultivo de la población celular LPA:**

Las ADASC obtenidas tras el procesamiento de la grasa previamente descrito se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Whittaker, Walkersville, MD, USA), piruvato sódico, glutamina y con solución de 100 U/mL de penicilina G y estreptomicina (Gibco-BRL) a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones de cultivo fueron las empleadas para todos los experimentos realizados en el estudio.

Todos los procedimientos celulares fueron realizados por personal experimentado, bajo asepsia y antisepsia en campana de flujo laminar y con material estéril, en el Laboratorio de Ingeniería Celular del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Paz (Madrid).

## **8. Prótesis de Poliacrilato de Etilo (PEA): estudios *in vitro*:**

### **8.1 Nomenclatura de los biomateriales empleados:**

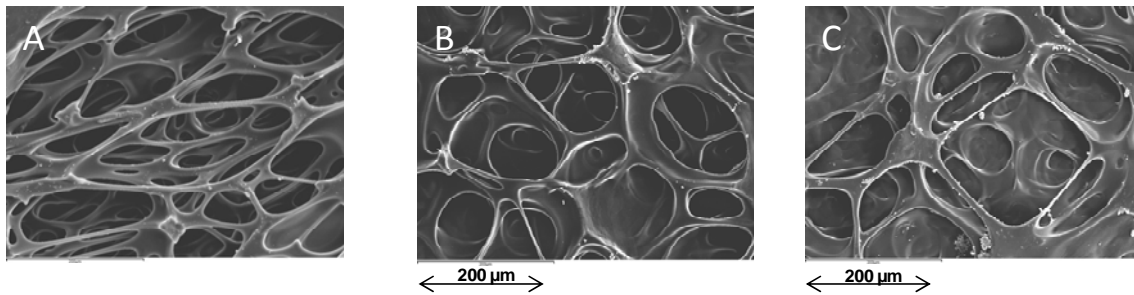
Inicialmente se analizó el comportamiento, en cultivo, de las ADASC sobre siete subtipos diferentes de prótesis compuestas de membranas macroporosas de poliacrilato de etilo (Figura 3). Estas prótesis fueron producidas y suministradas por el Departamento de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia (Valencia, España).

La biofuncionalización de las prótesis con diferentes recubrimientos biológicos (fibronectina, colágeno, queratán sulfato y péptido funcional FN7-10) fue realizada por la empresa Tecnalia (Bizkaia, España).

Las nomenclaturas/referencias de los biomateriales empleados se exponen a continuación (Tabla 2).

<b>Referencia</b>	<b>Material</b>
<b>1</b>	<b>Poliacrilato de Etilo (PEA)</b> Homopolímero del poli etil acrilato
<b>2</b>	<b>P(EA-co-HEA) 90/10</b> Copolímero de Poli (etil acrilato-co-hidroxietyl acrilato)90/10
<b>3</b>	<b>P(EA-co-HEA) 80/20</b> Copolímero de Poli (etil acrilato-co-hidroxietyl acrilato)80/20
<b>4</b>	<b>P(EA-co-AAc) 90/10</b> Copolímero de Poli (etil acrilato-co-ácido acrílico)90/10
<b>5</b>	<b>P(EA-co-MAAc) 90/10</b> Copolímeros de Poli (etil acrilato-co-ácido metacrílico)90/10
<b>6</b>	<b>P(EA-co-AAc) 80/20</b> Copolímero de Poli (etil acrilato-co-ácido acrílico)80/20
<b>7</b>	<b>P(EA-co-MAAc) 80/20</b> Copolímeros de Poli (etil acrilato-co-ácido metacrílico)80/20

**Tabla 2.-** Nomenclatura de las prótesis de poli-etil-acrilato (PEA) utilizadas.



**Figura 3.-** Imagen por microscopía electrónica de barrido de las membranas macroporosas de PEA: Ref-1 (A), Ref-2 (B), Ref-4 (C).

## 8.2 Evaluación de las características biofísicas de los biomateriales en cultivo:

Los diferentes biomateriales se introdujeron dentro de distintos pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos junto con 250  $\mu$ l medio de cultivo (con los componentes ya descritos previamente) con el objetivo de observar su comportamiento en condiciones reales de cultivo. Tras 24 horas se valoraron una serie de parámetros de manera cualitativa (SI/NO):

- A) *Estabilidad del pH del medio de cultivo:* en función de los cambios en el color del mismo.
- B) *Estabilidad física del biomaterial:* en función de los cambios en su tamaño.
- C) *Transparencia del biomaterial:* en función de los cambios en su transparencia.

## 8.3 Estudio de colonización celular de las Referencias 1-7 con/sin biofuncionalización con *Fibronectina* :

La biofuncionalización de las membranas de PEA consiste en anclar proteínas a su superficie con el objetivo de proporcionar ligandos de adhesión que teóricamente puedan optimizar la adherencia celular a la superficie del implante y mejorar así su colonización. Los



recubrimientos fueron realizados y suministrados por la empresa Tecnalía (Vizcaya, España) empleando para ello Fibronectina plasmática humana (Sigma, España), soluciones frías de colágeno y queratán sulfato (MES/EDAC/NHS) y plásmidos pET-11 de FNIII<sub>7-10</sub> (Invitrogen, España).

Los diferentes biomateriales (suministrados en forma de discos circulares de 100 µm de grosor y 8 mm de diámetro) se colocaron en distintos pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, se lavaron dos veces con PBS (Gibco-BRL) y posteriormente se añadieron 250µL de medio de cultivo. Tras 24 horas de pre-incubación se eliminó el medio de cultivo y se sembraron 250.000 células ADASC/pocillo (aproximadamente 40.000 células sobre el material) contenidas en 250µl de medio. El cultivo celular se mantuvo durante un mes, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas.

El recuento celular sobre los diferentes biomateriales se realizó tras la primera y cuarta semana de cultivo. Para ello se utilizó la tinción celular con Diamidino-2-phenylindone (DAPI, Sigma) in vivo: se añadió el DAPI a una concentración final de 5 ng/ml al medio de cultivo y las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Tras dos lavados con PBS, medio de cultivo nuevo se añadió a las células. Las fotografías de los núcleos teñidos se obtuvieron con un objetivo de 20x en el microscopio invertido de fluorescencia. Se fotografiaron al menos 5 campos diferentes aleatorios y se procedió al contaje celular. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon (Nikon Corporation, Tokyo, Japón) acoplada a un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss, y procesadas con el software Nis-elements (Nikon).

Se realizaron tres repeticiones de cada experimento, y al menos tres experimentos independientes para el análisis conjunto de los resultados. La significación estadística se analizó mediante la prueba de “t de Student”.

Los dos biomateriales que presentaron mejor colonización celular fueron seleccionados para los posteriores estudios, detallados a continuación.

#### 8.4 Estudio de colonización celular de los biomateriales seleccionados con/sin biofuncionalización con *colágeno +/- queratán sulfato* :

Los dos biomateriales seleccionados se emplearon en forma de prótesis circulares de 100 µm de grosor y 6 mm de diámetro para el resto de los experimentos (in vitro e in vivo).

En este estudio se evaluó si la colonización celular de estos dos biomateriales se veía incrementada con la adición de dos tipos diferentes de revestimientos sobre ellos, formando tres grupos de análisis:

- A) Biomaterial sin recubrimiento
- B) Biomaterial con recubrimiento de colágeno
- C) Biomaterial con recubrimiento de colágeno + queratán sulfato

El procedimiento de cultivo y contaje celular fue idéntico al descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que las prótesis fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 Wells (Corning, NY, USA) y se sembraron 100.000 células/pocillo contenidas en 100 µl de medio de cultivo.

Se realizaron tres repeticiones del experimento, y al menos tres experimentos independientes para el análisis conjunto de los resultados. La significación estadística se analizó mediante la prueba de “t de Student”.

#### 8.5 Estudio de colonización celular de los biomateriales seleccionados con/sin biofuncionalización con el *péptido funcional FN7-10*:

En este estudio se evaluó si el recubrimiento con únicamente el péptido funcional derivado de la fibronectina FN7-10 sobre los dos biomateriales seleccionados incrementaba su colonización celular *in vitro*. El procedimiento fue idéntico al ya descrito para el revestimiento de colágeno/queratán sulfato, y al igual que en todos los experimentos se realizaron tres repeticiones del estudio y al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se analizó mediante la prueba de “t de Student”.

***En función de los resultados de estos estudios se seleccionó el mejor tipo de biomaterial así como el mejor tipo de revestimiento para su aplicación en los ensayos *in vivo*.***

## **9. Lámina de córnea humana descelularizada: estudios *in vitro*:**

### **9.1 Técnica de descelularización corneal:**

El proceso de descelularización fue realizado por la empresa Tecnalía (Bizkaia, España) empleando el método de descelularización de Daniel (Daniel y cols.,2005), el cual se basa en la utilización de lauril-sulfato sódico (sodium dodecyl sulfate, SDS), detergente aniónico que rompe las células y a bajas concentraciones preserva la matriz extracelular. Se aplicaron una serie de modificaciones sobre la técnica original para la optimización del procedimiento, el cual se detalla a continuación:

Se utilizaron córneas humanas *ex vivo* suministradas por el banco de ojos de Lublin (Polonia) y el banco de ojos del centro de Oftalmología Barraquer (Barcelona). Las córneas seleccionadas, con evaluación óptima del estroma, fueron lavadas con PBS y antibiótico-antimicótico al 1%, congeladas (-20°C) y cortadas en láminas de 90 micras de grosor con un criotomo.

Todo el procedimiento se realizó bajo campana de flujo y con material estéril:

1. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PBS y antibiótico-antimicótico al 1% de las láminas.
2. Se incubaron las láminas en 10 ml de SDS 1% (w/v) con inhibidor de proteasas (Cód. 8340, Sigma-Aldrich) (según protocolo del proveedor) durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se realizaron 8 lavados de 15 minutos con PBS y antibiótico-antimicótico al 1% de las láminas para eliminar los restos de SDS.
4. Se incubaron las láminas con 5 mL de DNAsa (Benzonase 6.5 U/mL en tampón PBS, Merck) con inhibidor de proteasas a 37°C durante 72 horas.
5. Se realizaron 8 lavados de 15 minutos con PBS y antibiótico-antimicótico al 1% de las láminas para eliminar los restos de DNAsa.

En los estudios previos realizados por la compañía, para la confirmación de la adecuada descelularización del tejido tras el procedimiento, se realizaron análisis cuantitativos del contenido de ADN, utilizando el ensayo de Picogreen (Invitrogen), tras la digestión completa de las láminas con proteinasa K a 56°C (Gibert y cols., 2009). Se usaron como controles las córneas contralaterales de los mismos donantes, comparando láminas (tratadas y controles) de la misma altura de corte en la córnea. Estos estudios observaron que el contenido promedio de ADN en las láminas control era de 133,3 ng/lámina, mientras que el contenido promedio de ADN en las láminas descelularizadas era de 5,5 ng/lámina. El promedio del porcentaje de descelularización fue de 95,3%. La diferencia entre ambos contenidos de ADN era estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

A raíz de estos resultados, la compañía concluyó que las láminas corneales humanas descelularizadas obtenidas mediante este procedimiento (Daniel modificado) tenían un contenido de DNA menor al límite establecido y una matriz extracelular conservada con capacidad de recolonización.

## 9.2 Estudio de colonización celular de las láminas corneales humanas descelularizadas:

El objetivo de este estudio fue determinar la viabilidad de los cultivos de células ADASC sobre láminas corneales humanas previamente descelularizadas.

Las láminas se recibieron desde la compañía Tecnia, en forma de discos circulares flexibles de 7mm de diámetro, con un espesor de 90µm y conservadas en medio CorneaMax.

Veinticuatro horas antes de la siembra celular las láminas se transfirieron a una placa de 24 pocillos junto con medio de cultivo de células ADASC.

Las células, previamente teñidas con el marcador fluorescente Vybrant CM-Dil (proceso de tinción detallado en el siguiente apartado), se inyectaron en las láminas mediante una aguja de 26G, repartiendo el volumen de la suspensión celular (200.000 células contenidas en 500 µl) en 10 puntos distintos de la superficie de cada lámina, con el fin de obtener una distribución homogénea de las ADASC. Se centrifugaron las láminas durante 5 minutos a 500 rpm, para favorecer la adhesión celular a la lámina, y luego se incubaron a 37°C.

Se mantuvieron las láminas en cultivo durante 5 semanas, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas. La colonización celular del implante se analizó mediante la detección del Vybrant CM-Dil con microscopía de epifluorescencia utilizando el filtro de excitación-emisión a 546/590 nm tanto durante el cultivo como tras la fijación en formol e inclusión en parafina. Finalmente las secciones de las láminas se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Para estos ensayos se utilizaron 8 láminas provenientes de dos córneas donantes: Córnea 1: láminas 1.1-1.4; Córnea 2: láminas 2.1-2.4. Las láminas vienen ordenadas en función de su profundidad en el estroma original: la 1 es la más superficial (90-180 µm); 2 (180-270µm); 3 (270-360µm) y la 4 es la más profunda (360-450µm).

## 10. Prótesis de PEA / Lámina de córnea humana descelularizada: estudios *in vivo*:

### 10.1 Preparación de las prótesis en el laboratorio:

Los procedimientos de marcaje y colonización celular de las prótesis por parte de las ADASC fueron idénticos para ambos tipos de prótesis implicadas en el estudio *in vivo* con animales de experimentación: 1) Subtipo de biomaterial de PEA elegido; 2) Lámina de córnea humana descelularizada.

#### *10.1.1 Cultivo de las células ADASC:*

El cultivo celular del LPA/ADASC se realizó de la misma manera que en los estudios *in vitro* ya comentados: medio DMEM + FBS al 10% + piruvato sódico + glutamina + solución de 100 U/mL de penicilina G y estreptomina; a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *10.1.2 Marcaje celular de las ADASC:*

Las células ADASC en cultivo fueron incubadas con una solución fluorescente de dialquilcarbocianina (dilución 1:200 en D-PBS) de nombre comercial Vybrant CM-Dil (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 5 minutos. Tras su posterior lavado, las células se mantuvieron en medio de cultivo hasta su utilización para la siembra de las prótesis. Mediante este procedimiento las membranas de los orgánulos intracitoplasmáticos de las células que se iban a trasplantar quedaron marcadas con fluorescencia en rojo, con el objetivo de poder distinguir estas células por microscopía de fluorescencia en los cortes histológicos de las

córneas de los animales de experimentación a los que se les realizase el trasplante celular junto con la prótesis.

Media hora antes de realizar la siembra celular de las prótesis, las células previamente marcadas se tripsinizaron y resuspendieron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS).

### 10.1.3 Siembra celular de las prótesis:

Dos tipos de prótesis:

- A) **PEA**: prótesis circulares de 100  $\mu\text{m}$  de grosor y 6 mm de diámetro
- B) **Lámina de cornea humana descelularizada**: discos circulares flexibles de 90 $\mu\text{m}$  de grosor y 6-7 mm de diámetro. Se utilizaron láminas estromales profundas (desechando las láminas correspondientes a las primeras 180 micras del estroma de la córnea original).

Procedimiento:

- **Día 1: Pre-incubación/Hidratación**: Las diferentes prótesis se colocaron en distintos pocillos de una placa de cultivo de 96 Wells, se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo.

Lámina de córnea descelularizada (diferencias en la técnica): placa de cultivo de 24 pocillos. 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo.

- **Día 2: Siembra de la primera cara**: Tras 24 horas de pre-incubación se eliminó el medio de cultivo y se sembraron 50.000 células ADASC/pocillo contenidas en 100  $\mu\text{l}$  de medio sobre la primera cara de la prótesis.

Lámina de córnea descelularizada (diferencias en la técnica): Inyección, con aguja de 26G, de 200.000 células ADASC/lámina contenidas en 500  $\mu\text{l}$  de

medio, repartiendo el volumen de la suspensión celular en 5 puntos distintos de la primera cara de la lámina.

- **Día 3: Siembra de la segunda cara:** Tras 24 horas de cultivo se eliminó el medio y se volteó la prótesis para exponer hacia arriba la otra cara del disco circular. Se sembraron de nuevo 50.000 células ADASC/pocillo contenidas en 100 µl de medio sobre la segunda cara de la prótesis.

Lámina de córnea descelularizada (diferencias en la técnica): Inyección de 200.000 células ADASC/lámina contenidas en 500 µl de medio, repartiendo el volumen de la suspensión celular en 5 puntos distintos de la segunda cara de la lámina.

- **Día 4: Cultivo + Transporte:** Tras 24 horas de cultivo se eliminó el medio de cada uno de los pocillos (eliminación de células muertas y no adheridas) y se introdujeron las prótesis celularizadas en tubos de ensayo de plástico junto con medio de cultivo nuevo. Cada uno de los tubos se rotuló con el número de lámina correspondiente (1-18) y se transportaron en un incubador portátil (37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>) para proceder a las cirugías experimentales al día siguiente.
- **Día 5: Cirugías en modelo animal in vivo.**

#### 10.1.4 Transporte:

El transporte entre el Laboratorio de Ingeniería Celular del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (Madrid) y el Laboratorio de Investigación del Centro Oftalmológico Vissum de Alicante (Alicante) se llevó a cabo mediante un incubador portátil (Labotect Cell-Trans 4016, Labortechnik Göttingen) que mantiene unas adecuadas condiciones de cultivo (37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>) durante las cuatro horas de transporte.



#### 10.1.5 Prótesis control:

Las prótesis que no fueron sembradas con ADASC para su utilización como grupo control en los experimentos in vivo, fueron sometidas a los mismos procedimientos ya expuestos para las prótesis celularizadas, con excepción de la propia siembra celular. Se rotularon de la misma manera sus tubos de ensayo con el número correspondiente de prótesis.

#### 10.1.6 Enmascaramiento del diseño experimental:

Se mantuvo en todo momento un **triple ciego**, pues ni los investigadores involucrados en el protocolo quirúrgico y seguimiento clínico, ni los patólogos involucrados en los análisis post-eutanasia conocían el tipo de prótesis (celularizada / control) implantada en cada animal.

### 10.2 Protocolo quirúrgico:

#### 10.2.1 Modelo animal:

Como modelo experimental se utilizó el conejo adulto albino de raza New Zealand (Figura 4), crecido en la Granja San Bernardo en España. Para la realización de los experimentos se utilizaron 48 conejos de esta raza.



**Figura 4.-** Conejo adulto de raza New Zealand utilizado en los estudios

## 10.2.2 Diseño: (Figura 5)

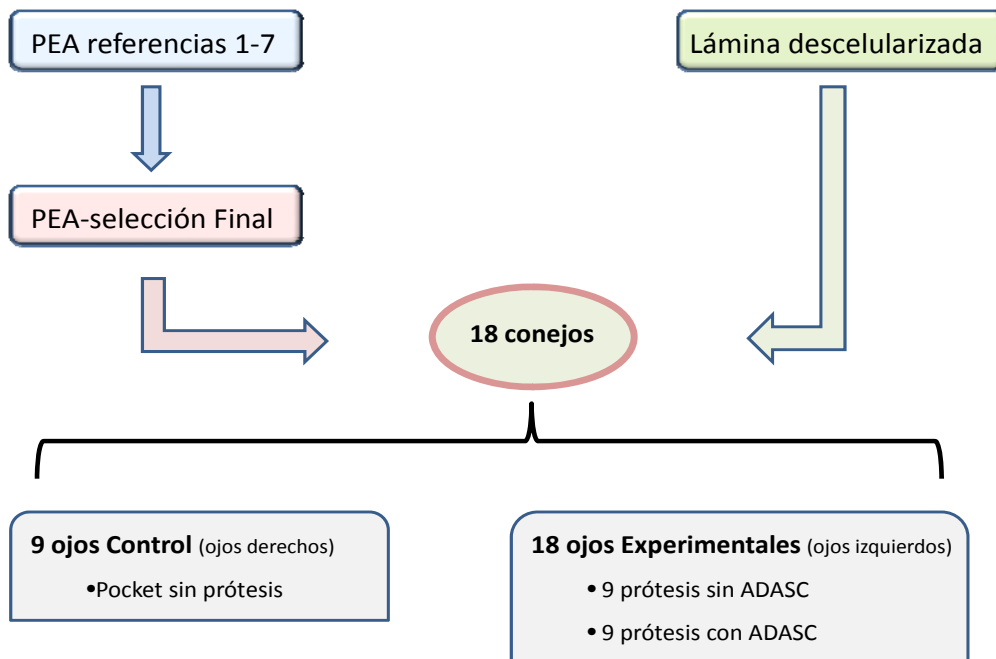


Figura 5.- Diseño experimental

## 10.2.3 Procedimiento quirúrgico:

Las cirugías fueron realizadas por el autor de la presente Tesis Doctoral con la ayuda del Dr. El-Aswad, oftalmólogo especialista en córnea y segmento anterior.

Todas las cirugías se realizaron en los quirófanos del animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante) bajo microscopio quirúrgico Leica, con el cual se realizaron fotografías de todos los casos realizados.

El procedimiento constaba de las siguientes etapas:

➤ **Anestesia:**

- Sistémico (intramuscular): Ketamina 35 mg/kg + Xilacina 10 mg/kg
- Tópica: Oxibuprocaina / tetracaína (Anestésico doble Cusí, Alcon).

➤ **Esquema quirúrgico:**

- Ojo Derecho (Control): Pocket sin prótesis + Sutura o Nada
- Ojo Izquierdo (Experimental): Pocket + Prótesis + Sutura

➤ **Técnica quirúrgica:**

Bajo anestesia general + tópica, asepsia y antisepsia se realizó: (Figura 6)

- Preincisión corneal paralimbar en córnea clara a 1 mm de limbo. Preincisión de 5 mm de longitud y 50% de espesor utilizando un cuchillete de 45° (Sharptome TM, Sharpoint).
- Diseción manual del bolsillo intraestromal (pocket) con una profundidad del 50% aproximadamente del espesor corneal utilizando un cuchillete de minicrescent (Sharptome TM, Sharpoint).
- Ampliación del pocket intraestromal hasta obtener un diámetro de 7-8 mm, utilizando el mismo cuchillete de minicrescent.
- Introducción de prótesis circular dentro del bolsillo intraestromal con ayuda de espátula plana.
- Estiramiento completo de la prótesis mediante masaje externo con espátula desde una superficie corneal previamente irrigada con suero estéril.
- Sutura de incisión corneal con dos puntos sueltos de Nylon 10/0 o un punto en cruz.
- Fotografía con microscopio quirúrgico.
- Oftacilox + Ciclopléjico tópicos (Alcon) tras la conclusión de la cirugía

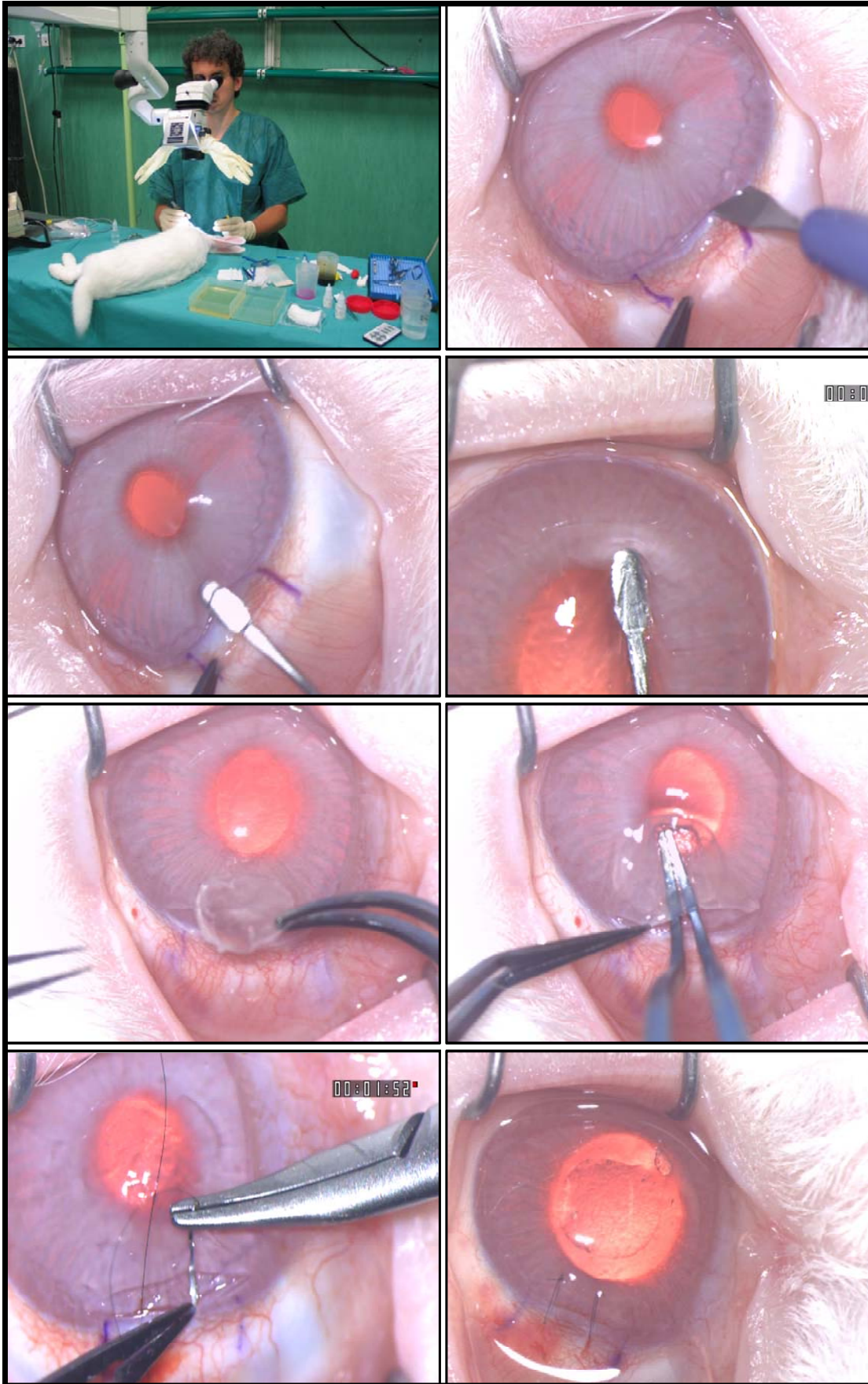


Figura 6.- Procedimiento quirúrgico (aumento 2X).

### 10.3 Protocolo postquirúrgico:

#### 10.3.1 *Tratamiento postquirúrgico:*

- **Ciprofloxacino hidrocloreuro** (antibiótico) 3 mg/ml tópico (Oftacilox, Alcon): 1 gota cada 12 horas durante 3 días.
- **Ciclopentolato hidrocloreuro** (analgésico) 10 mg/ml tópico (Colircusi Ciclopléjico, Alcon): 1 gota cada 12 horas durante 3 días.
- **Buprenorfina** (analgésico) 0,05 mg/kg subcutánea: 1 inyección cada 12 horas durante 4 días.
- **Paracetamol** (analgésico) 100mg/100ml: en el agua del biberón durante los primeros 7 días.

#### 10.3.2 *Seguimiento postquirúrgico:*

Los animales fueron examinados por un oftalmólogo independiente bajo anestesia general (usando el mismo protocolo farmacológico que durante las cirugías) con el microscopio quirúrgico Leica y lámpara de hendidura durante el postoperatorio en los siguientes momentos: 1ª semana, 2ª semana, 1<sup>er</sup> mes, 2º mes y 3<sup>er</sup> mes tras la cirugía, momento en que se sacrificó a los animales.

En cada una de estas exploraciones se tomaron fotografías de todos los ojos (derechos e izquierdos) con el microscopio quirúrgico. Las suturas se retiraron dentro del primer mes postquirúrgico, y la eutanasia de los conejos se realizó con la revisión del tercer mes.

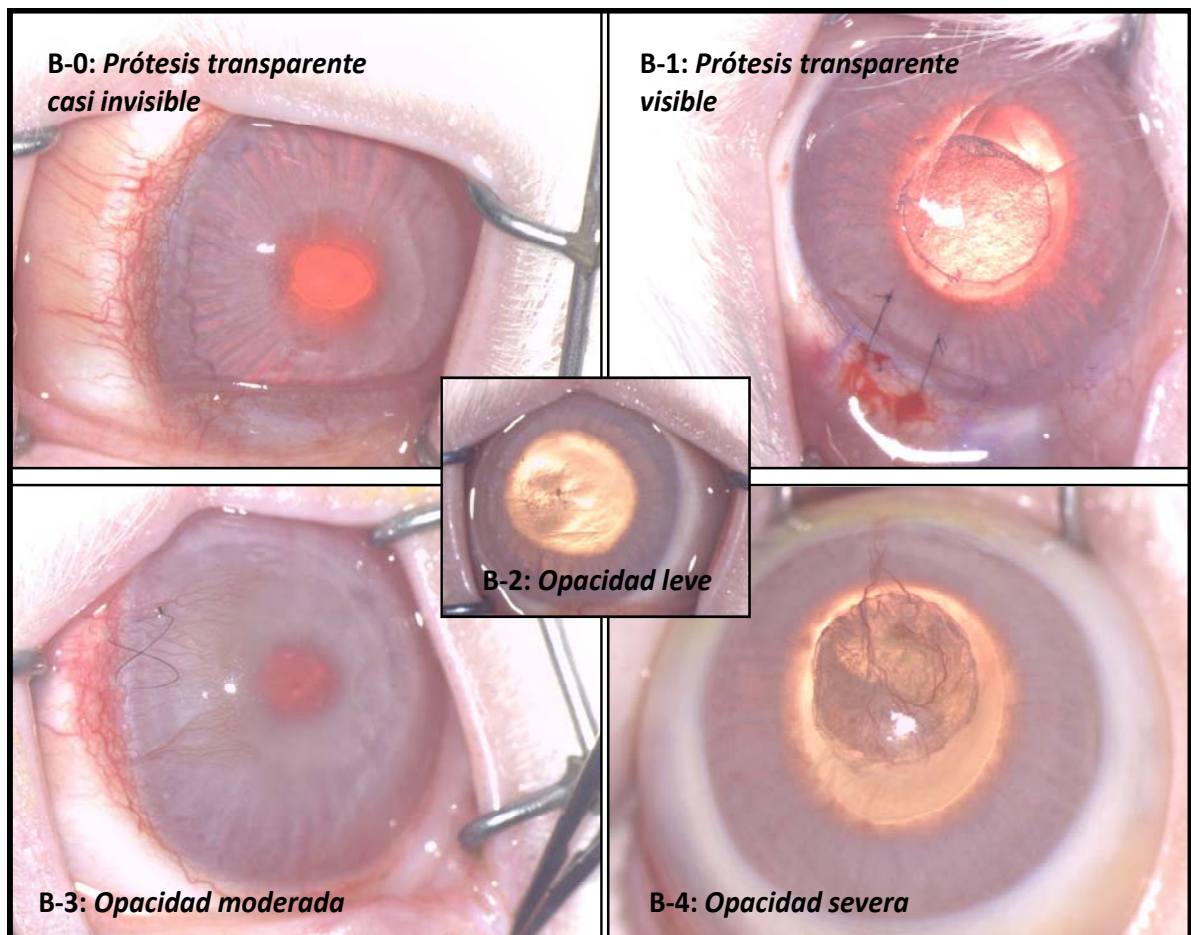
Para la evaluación clínica oftalmológica durante las diferentes exploraciones se siguió el siguiente esquema de valoración con puntos:



➤ **Transparencia corneal:**

- **A:** Periferia (área por fuera del implante)
- **B:** Central (área central donde se encuentra el implante)
- *Graduación: 0-4* (donde 0 es totalmente transparente y 4 es totalmente opaco) (Figura 7).

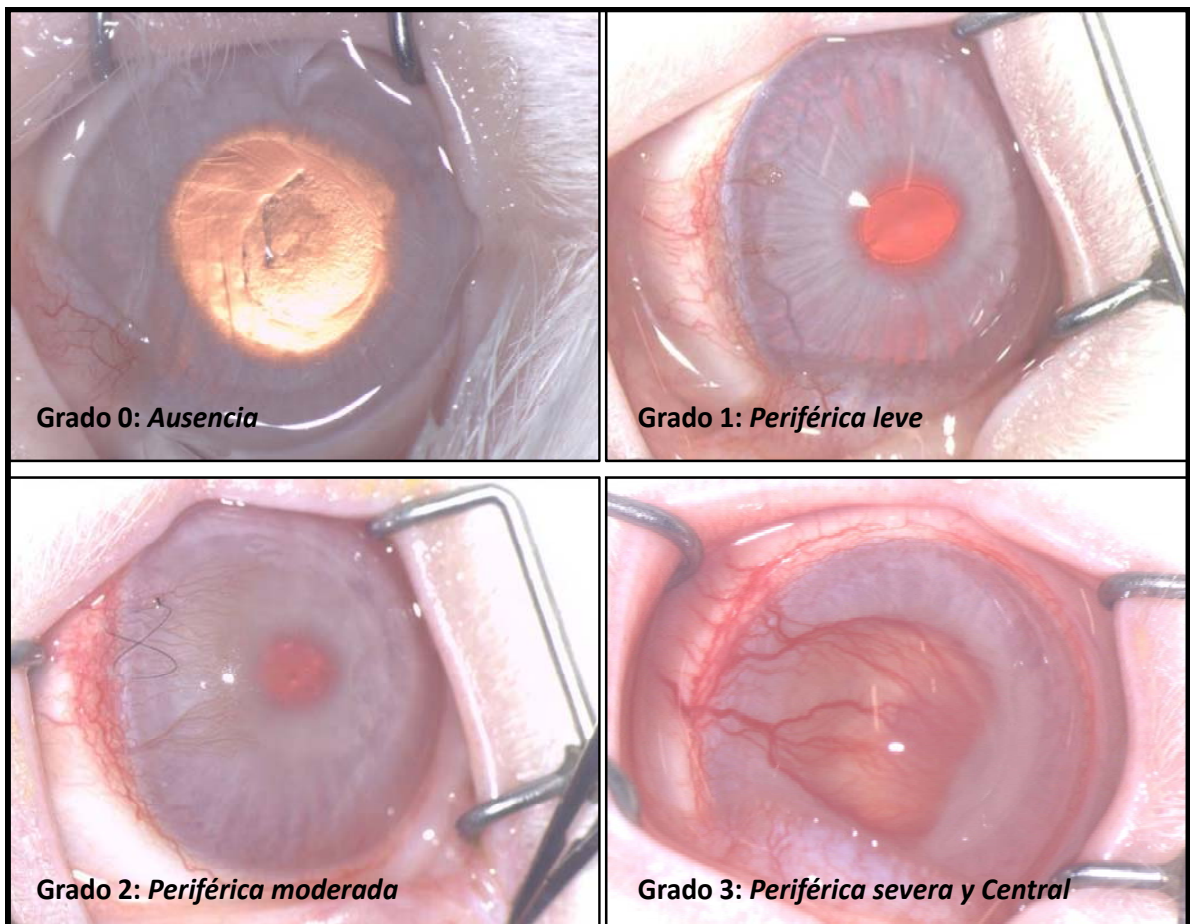
**Figura 7-** Graduación de la transparencia corneal (ejemplos de grados 0 a 4) (aumento 2X).



➤ **Vascularización corneal:**

- **A:** Vascularización corneal superficial
- **B:** Vascularización corneal profunda
- *Graduación: 0-3* (donde 0 es ausencia de neovascularización y 3 la representa en su máximo grado) (Figura 8).

**Figura 8.-** Graduación de la vascularización corneal (ejemplos de grados 0 a 3) (aumento 2X).



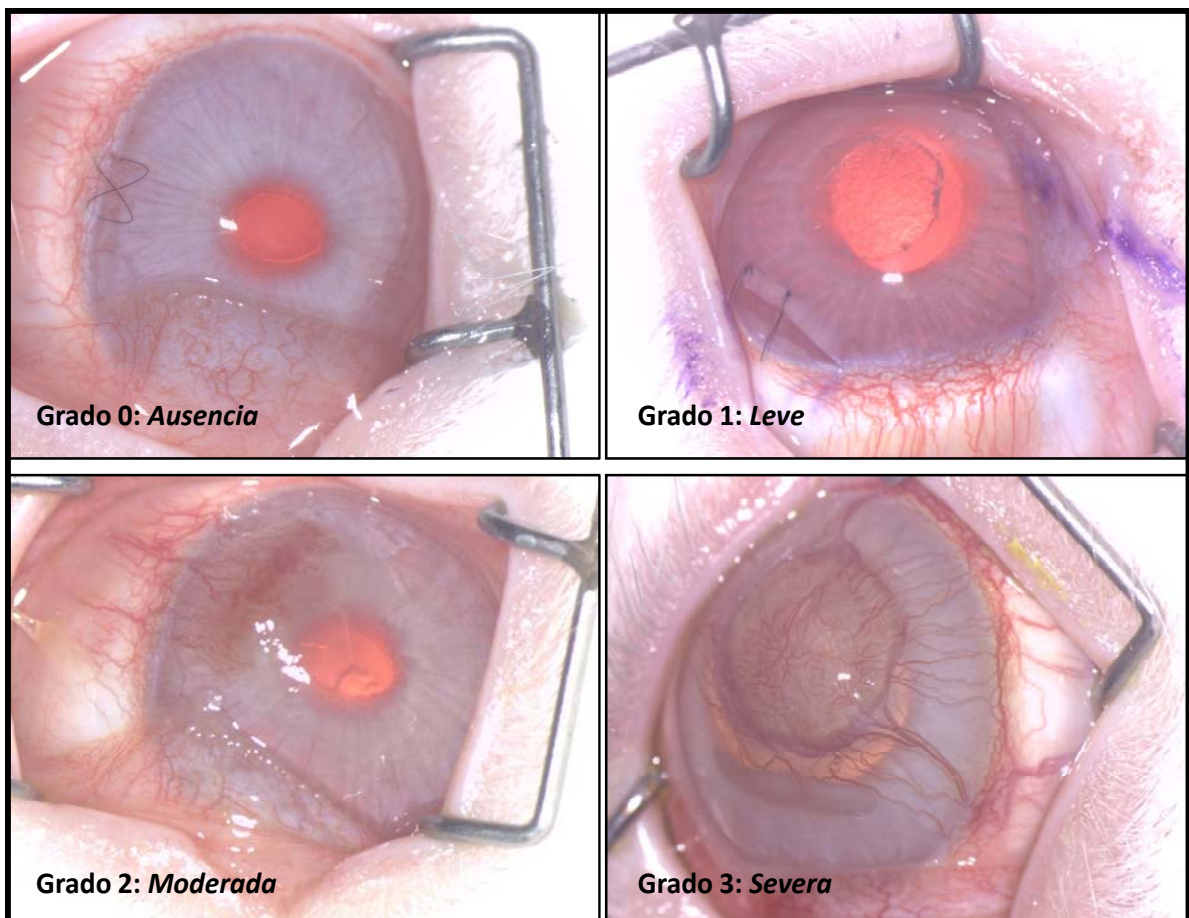
➤ **Cámara anterior (CA):**

- *Graduación: 0-4* (donde 0 es CA muy profunda y 4 refleja atalamia).

➤ **Inyección conjuntival:**

- *Graduación: 0-3* (donde 0 es ausencia de inyección y 3 inyección severa)  
(Figura 9).

**Figura 9.-** Graduación de la inyección conjuntival (ejemplos de grados 0 a 3) (aumento 2X).





### 10.3.3 Eutanasia:

Los animales fueron sacrificados junto con la exploración del tercer mes, utilizando por vía intravenosa una solución de eutanasia conocida como T-61 que contiene una combinación de embutramida, yoduro de mebezonio e hidrocloreto de tetracaína. Los ojos fueron enucleados a continuación y fijados en formalina tamponada al 10% durante 24 horas.

## 10.4 Análisis postmortem:

### 10.4.1 Anatomía patológica:

El análisis histológico fue realizado por el patólogo Dr. Severino Rey (USP Hospitales, Alicante) y la Unidad de Histología (Departamento de Patología) de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Los patólogos desconocían los objetivos del estudio y si las prótesis analizadas eran experimentales o controles, asegurando de esta manera el triple ciego.

Los ojos completos enucleados y conservados en formol tamponado se seccionaron en dos mitades (“a” y “b”), de manera que la mitad “b” contenía el cristalino completo. Se procesaron los dos hemiglobos por procedimientos histológicos estándar, de manera que se obtuvieron 2 bloques de parafina de cada ojo (“a” y “b”). Los bloques “a” de cada ojo se utilizaron para el estudio histológico, mientras que los bloques “b” quedaron reservados para estudios posteriores.

Se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de espesor de los bloques “a” para su tinción con hematoxilina-eosina (HE) y Tricrómico de Masson, para su posterior examen con microscopía óptica para la evaluación del nuevo patrón histológico del estroma corneal resultante tras la implantación de

las diferentes prótesis. La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio Leica DMLB y las imágenes se capturaron a través de una cámara Leica DFC320.

#### *10.4.2 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil :*

Algunos de los cortes de los ojos enucleados fueron utilizados para el análisis con microscopía de epifluorescencia utilizando el filtro de excitación-emisión a 546/590 nm para localizar las células teñidas con CM-Dil, que correspondían a la población celular de ADASC de origen humano.

#### *10.4.3 Inmunohistoquímica del proteoglicano queratocán:*

Con el fin de demostrar si las células ADASC eran capaces de diferenciarse en queratocitos funcionales, se procedió a inmunodetectar el queratocán, proteoglicano específico del estroma corneal y marcador de queratocitos, en las secciones de córnea incluidas en parafina (bloques "b"). Para ello los cortes de córnea fueron incubados toda la noche con el anticuerpo primario anti-queratocán humano producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilución 1:25). Posteriormente, se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con biotina (Vector), a una dilución 1:100. Seguidamente, se adicionó la avidina-AMCA (Vector) a una dilución de 1:100, que fluoresce en azul, por lo que en el mismo corte se podía, simultáneamente, identificar el queratocán y localizar las células humanas teñidas en rojo con CM-Dil. Como control negativo se utilizó el ojo contralateral al tratado con implante, y como control positivo se utilizaron córneas humanas de una autopsia realizada en el Hospital Universitario La Paz y depositada en el Biobanco de la Institución. La expresión de queratocán humano se confirmó por microscopía de fluorescencia.

## **11. Análisis estadísticos empleados:**

### **11.1 Estudios *in vitro*:**

El análisis estadístico de los estudios *in vitro* fue estándar de tipo paramétrico ya que se realizaron al menos 3 experimentos y cada uno de ellos por triplicado, es decir  $n=9$  para cada condición, por lo que se usó la “**t de Student**” con la **modificación de Bonferroni**.

### **11.2 Estudios *in vivo*:**

El análisis estadístico de los estudios *in vivo* fue de tipo no paramétrico mediante el **test de Mann-Whitney**. En el caso de los estudios *in vivo* con prótesis de PEA, debido al elevado número de comparaciones necesarias, se aplicó la modificación de Bonferroni a este test con el objetivo de reducir la probabilidad de cometer errores de tipo I. Por tanto consideramos diferencias significativas cuando el nivel crítico obtenido fue menor de 0,0083.

# *Resultados*

---

## 12. Prótesis de Poliacrilato de Etilo (PEA): estudios *in vitro*:

### 12.1 Evaluación de las características biofísicas de los biomateriales:

Tras 24 horas de incubación en medio de cultivo de cada uno de los siete biomateriales, se analizaron las propiedades biofísicas de los mismos de manera cualitativa (Si/No). Los resultados se exponen en la siguiente tabla (Tabla 3):

Material	Estabilidad pH	Estabilidad Física	Transparencia	Viabilidad celular
Referencia 1	Si	Si	Si	Si
Referencia 2	Si	Si	Si	Si
Referencia 3	Si	Si	Si	Si
Referencia 4	Si/No	Si	Si	Si
Referencia 5	No	Si	No	?
Referencia 6	No	No	No	?
Referencia 7	No	No	No	?

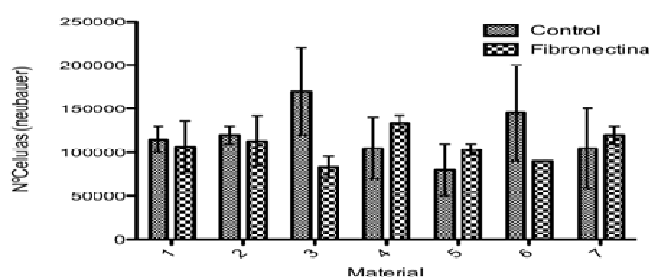
**Tabla 3.-** Propiedades biofísicas de los PEA utilizados

- a. Estabilidad del pH: Las Referencias 5-6-7 produjeron cambios en la coloración del medio de cultivo (de rojo [pH 6,8] a amarillo [pH 5,2]), reflejando una acidificación del mismo. La referencia 4 produjo un cambio sutil en la coloración del medio (naranja).
- b. Estabilidad física: Las referencias 6 y 7 experimentaron un incremento en su tamaño como consecuencia de la hidratación del biomaterial.
- c. Transparencia: Las referencias 5-6-7 se mantuvieron opacas en condiciones de cultivo, lo cual dificultaba cualquier análisis de viabilidad celular sobre las mismas.

## 12.2 Estudio de colonización celular de las Referencias 1-7 con/sin biofuncionalización con *Fibronectina*:

En las siguientes gráficas exponemos los resultados de la colonización de los diferentes biomateriales por parte de las ADASC tras 1 y 4 semanas de cultivo. Se expone el número total de células (teñidas con DAPI) detectadas, empleando la cámara de Neubauer para su conteo. Mostramos los resultados en conjunto de los tres experimentos realizados, con intervalos de confianza del 95% (Figuras 8 y 9). No detectamos diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la colonización de los diferentes biomateriales con o sin revestimiento de fibronectina, excepto para la referencia-3 tras una semana de cultivo y la referencia-4 tras cuatro semanas de cultivo, demostrando en ambos casos una mayor colonización en el grupo control (sin fibronectina).

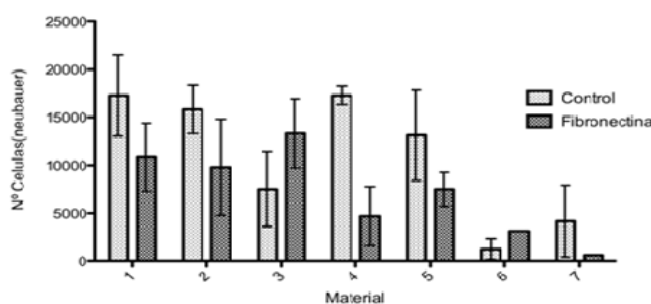
### a. *Contaje celular tras 1 semana de cultivo (Figura 10):*



**Figura 10.-** Contaje celular

(Nº Cel) tras 1 semana.

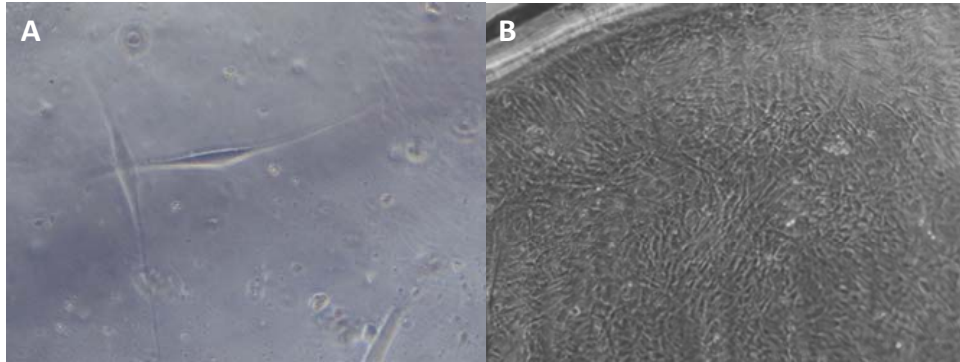
### b. *Contaje celular tras 4 semanas de cultivo (Figura 11):*



**Figura 11.-** Contaje celular

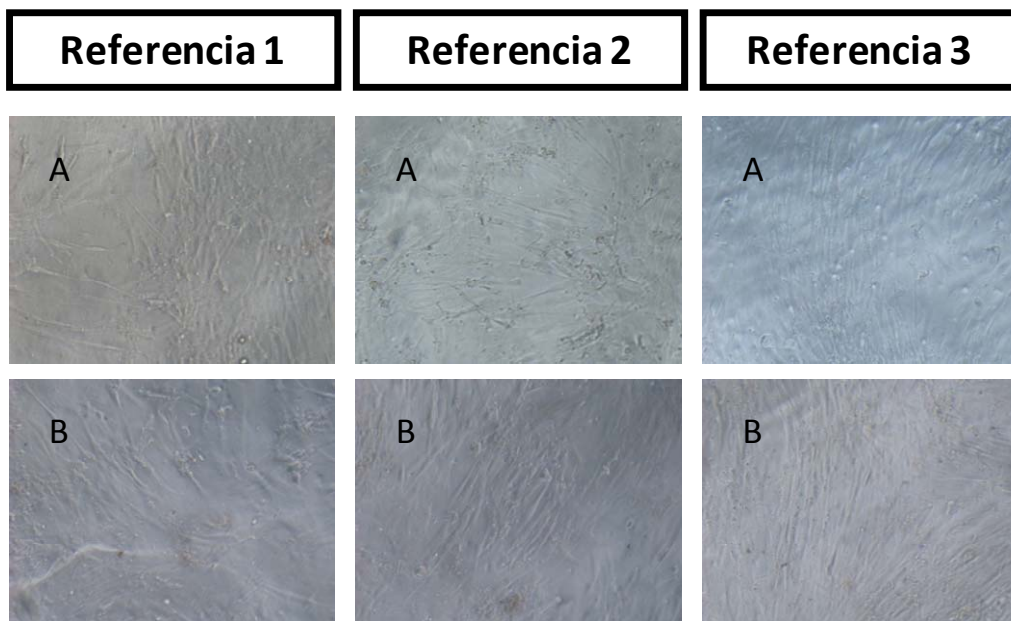
(Nº Cel x 10<sup>1</sup>) tras 4 semanas.

La morfología ahusada normal de la célula se mantuvo en los cultivos sobre todos los biomateriales (Figura 12A) excepto sobre la referencia-6, donde las células adquirieron una morfología poligonal a la semana de cultivo (Figura 12B).



**Figura 12.-** Morfologías celulares encontradas durante el cultivo sobre PEA. A: Ref-2, morfología ahusada normal (aumento 400X); B: Ref-6, morfología poligonal (aumento 200X)

Se exponen a continuación fotografías que muestran la colonización (tras 1 semana) de algunos biomateriales sin fibronectina (Figura 13A) y con fibronectina (Figura 13B).



**Figura 13.-** Colonización celular de las referencias 1-2-3 sin fibronectina (A) y con fibronectina (B) (aumento 400X).

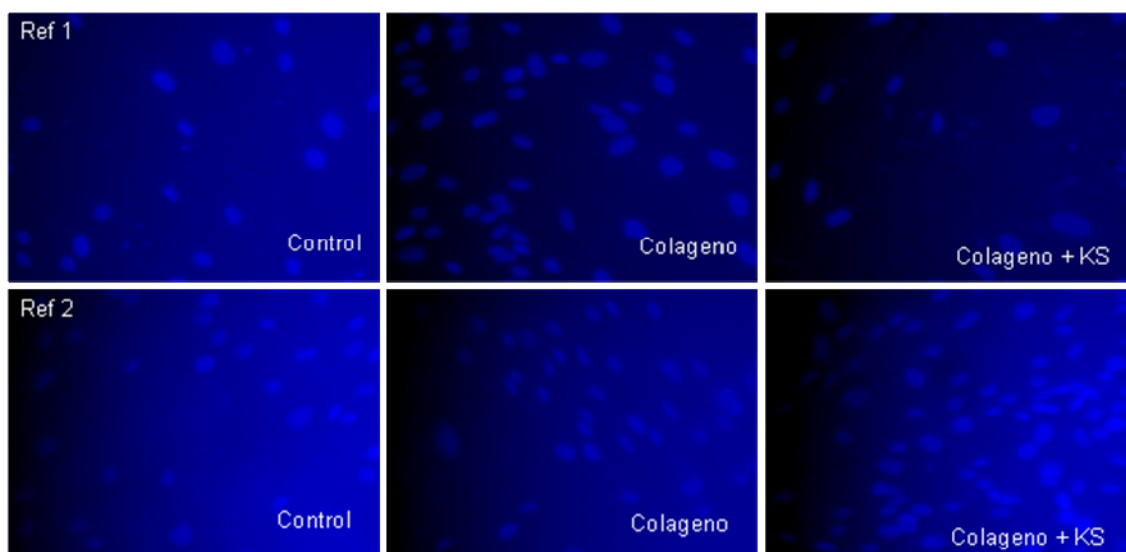
Aunque la viabilidad celular sobre el PEA era buena, no se encontraron figuras mitóticas en las células que colonizaban los biomateriales. Se observó además que gran parte de las células cultivadas migraban fuera del biomaterial tras 1 semana de cultivo.

El conteo celular sobre las referencias 3, 4, 5 y 7 se vio dificultado por la falta de transparencia y la autofluorescencia que presentaban estos biomateriales.

***Teniendo en cuenta todos estos resultados, se seleccionaron las referencias 1 y 2 para los siguientes experimentos por presentar las mejores tasas de colonización celular y un óptimo perfil biofísico.***

### 12.3 Estudio de colonización celular de las Referencias 1 y 2 con/sin biofuncionalización con colágeno $\pm$ queratán sulfato (KS):

Como ya se ha comentado, el procedimiento de conteo celular fue idéntico al experimento anterior. El tiempo óptimo de cultivo fue de 4-7 días (Figura 14), tras los cuales el número de células disminuía lenta y progresivamente.



**Figura 14.-** Colonización celular de las referencias 1 y 2 con sus diferentes recubrimientos a estudio a los 7 días de cultivo. Fluorescencia celular tras tinción con DAPI (aumento 400X).



### 12.3.1 Referencia 1 (una semana de cultivo):

El recubrimiento de colágeno mejoró levemente la supervivencia celular, mientras que el de colágeno + queratán sulfato la mejoró con carácter más pronunciado (Figura 15). Sin embargo las diferencias entre los tres grupos no fueron estadísticamente significativas para esta referencia ( $p > 0,05$ ).

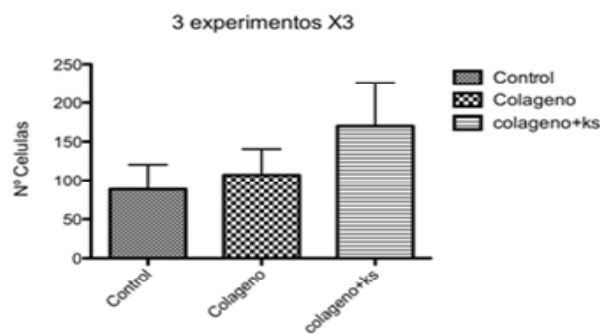


Figura 15.- Contaje celular (Nº Cel x 10<sup>3</sup>) tras 1 semana.

### 12.3.2 Referencia 2 (una semana de cultivo):

El recubrimiento de colágeno mejoró levemente la supervivencia celular, mientras que el de colágeno + queratán sulfato la mejoró con carácter más pronunciado (Figura 16). En este caso la diferencia entre el grupo control y el colágeno+Ks fue estadísticamente significativa ( $*p < 0,05$ ).

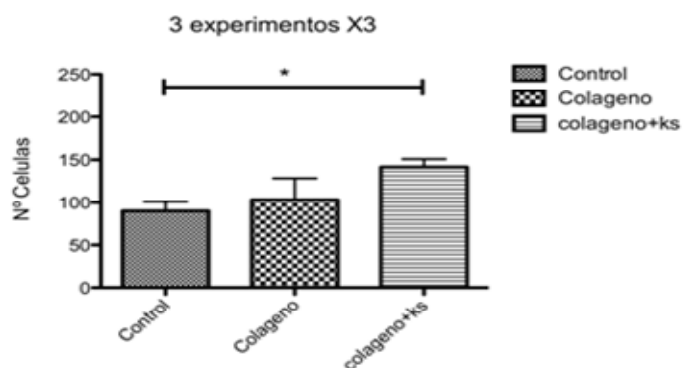
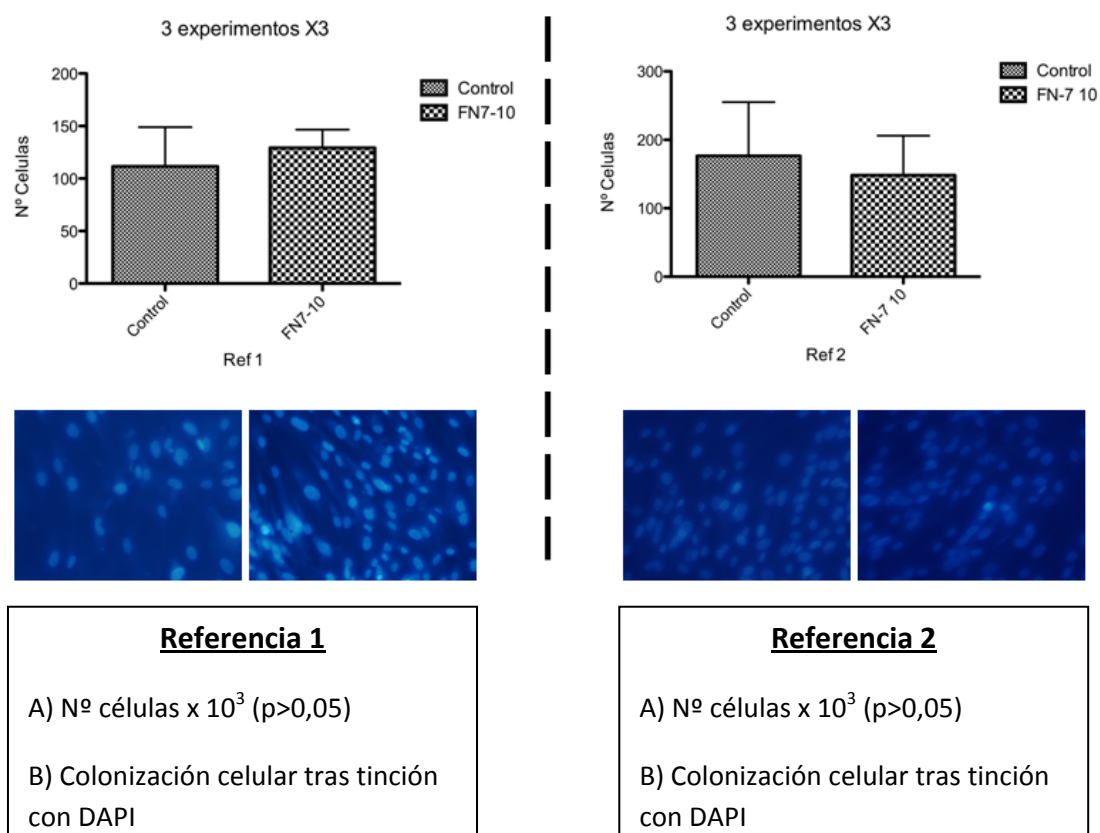


Figura 16.- Contaje celular (Nº Cel x 10<sup>3</sup>) tras 1 semana.

## 12.4 Estudio de colonización celular de las Referencias 1 y 2 con/sin biofuncionalización con el péptido funcional FN7-10:

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la colonización celular de las referencias 1 y 2 con revestimiento de FN7-10 y la colonización celular de estos biomateriales sin dicho revestimiento (Figura 17).



**Figura 17.-** Colonización celular referencias 1 y 2 con/sin recubrimiento de FN7-10 (aumento 400X).

**Se seleccionó la referencia 1 con recubrimiento de colágeno + queratán sulfato para los ensayos sobre modelo animal in vivo, ya que la supervivencia celular era mayor.**

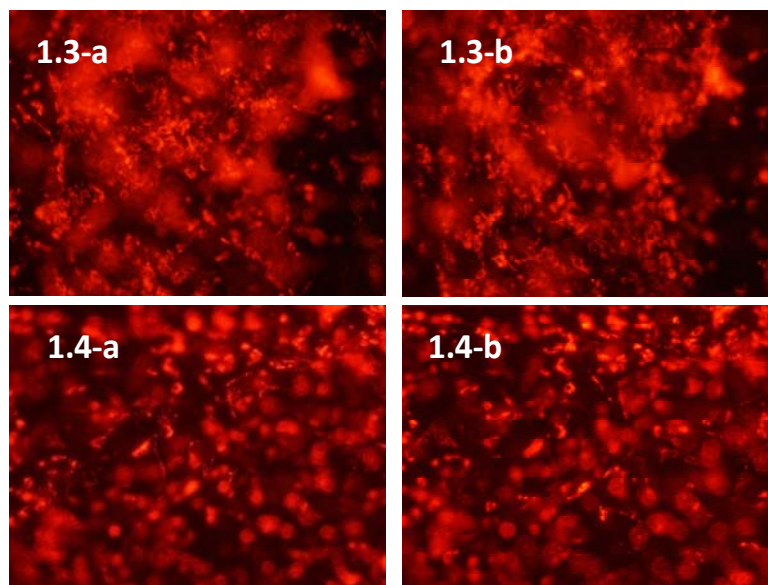
### 13. Lámina de córnea humana descelularizada: estudio de colonización celular *in vitro*:

Tras 5 semanas de cultivo se analizaron:

#### 13.1 Fluorescencia del marcador Vybrant CM-Dil:

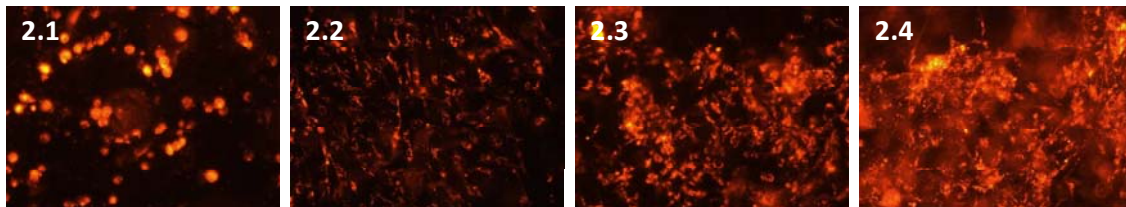
##### *13.1.1 Lámina en fresco (previa trasplante):*

Se observó una buena colonización de la lámina a las 5 semanas de cultivo. Tras las primeras 24 horas desde la siembra celular ya se observó que la colonización celular era adecuada, con la detección de multitud de células tanto en la superficie como en el interior de la lámina (con el microscopio se pudieron ver células a diferentes enfoques y por tanto a diferentes profundidades de la misma)(Figura 18). Además las células ADASC mantuvieron su morfología original y, aunque no parecían proliferar de manera apreciable, tampoco se observó mortalidad celular asociada.



**Figura 18.-** Ejemplos de dos láminas (1.3 y 1.4) 24 horas post-siembra de las ADASC. En los dos casos se muestra el mismo área con dos enfoques distintos (a y b) para evidenciar que las células resultan sembradas en planos distintos de las láminas (1.3-aumento 200X; 1.4-aumento 400X)

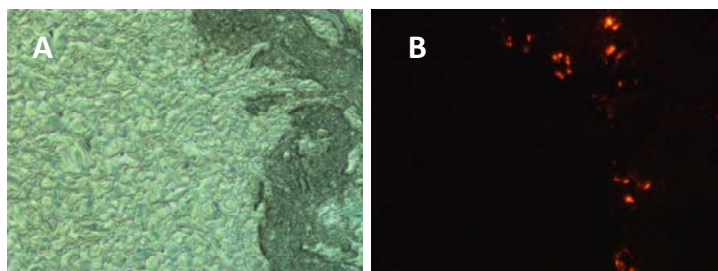
También se observó que la colonización celular parecía ser más eficiente en las láminas más interiores de las córneas (Figura 19), característica que aunque resultó ser más evidente con la córnea 2, también se pudo apreciar en los cultivos de las láminas de la córnea 1.



**Figura 19.-** Cultivo de ADASC sobre las láminas de la córnea numero 2 (2.1, 2.2, 2.3 y 2.4) tras 5 semanas. Obsérvese como la colonización celular de las láminas va aumentando progresivamente conforme mayor es su profundidad en la córnea original (aumento 200X).

### 13.1.2 Lámina fijada en formol e incluida en parafina:

Se evidenció una presencia celular menor de lo esperado (Figura 20), visto el grado de confluencia de las ADASC durante el cultivo a partir de las primeras 24 horas, posiblemente debido a la manipulación de las láminas (muy finas y flexibles) durante su proceso de fijación e inclusión en parafina, causando una pérdida celular significativa.

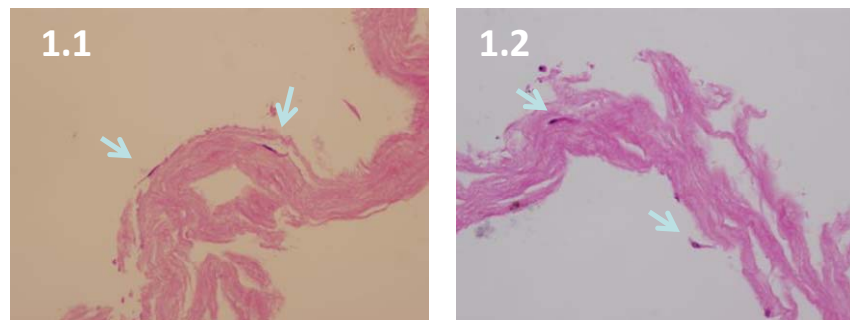


**Figura 20.-** Corte transversal de la lámina 1.1 (A) en el que se observa en rojo (B) la señal de fluorescencia asociada al marcador celular Vybrant CM-Dil (aumento 400X).

### 13.2 Tinción con hematoxilina-eosina:

Se confirmó la presencia celular menor de lo esperado que se había observado ya con la inmunofluorescencia tras la fijación e inclusión en parafina de las láminas.

A pesar del proceso de siembra por inyección, la mayoría de las células se observaron en la superficie de las láminas, aunque una pequeña parte penetró hacia el interior (Figura 21).



**Figura 21.-** Ejemplos de cortes transversales de las láminas 1.1 y 1.2, teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas indican la presencia de células tanto en la superficie como en el interior de las láminas (aumento 200X).

## 14. Prótesis de Poliacrilato de Etilo (PEA): estudios *in vivo* sobre modelo animal:

### 14.1 Selección del biomaterial:

Se realizó la experiencia quirúrgica completa (18 casos) con la Referencia 1 porque, además de presentar un buen perfil biofísico y de colonización celular, se corresponde con el biomaterial PEA “virgen”, es decir, sin modificaciones químicas añadidas a su estructura original (homopolímero de poli etil acrilato), por lo que dimos preferencia a ensayar el comportamiento de este PEA básico *in vivo*.

### 14.2 Referencia 1 [Homopolímero de poli etil acrilato]:

#### *14.2.1 Cirugías:*

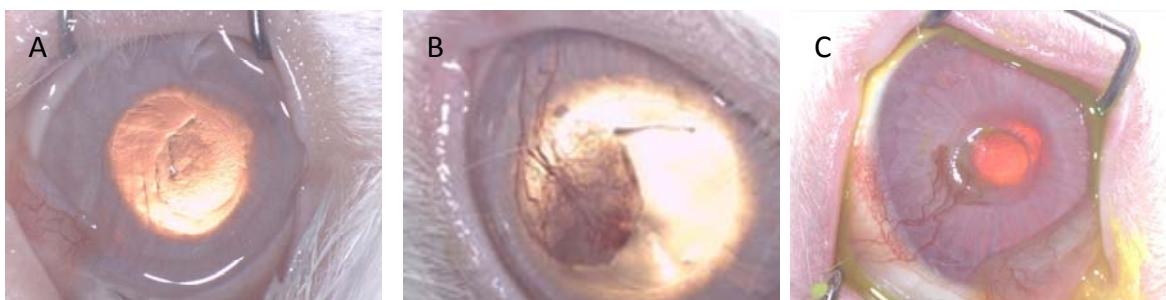
Se realizaron 9 ojos control (pocket sin prótesis) y 18 ojos experimentales (pocket con prótesis). Se produjo un caso de perforación posterior hacia cámara anterior (ojo control del conejo 1) y cinco casos de laceración anterior del pocket (ojo experimental del conejo 1 y ojo control de los conejos 3, 9, 11 y 13). Excepto en el conejo 3 donde la extensa laceración

requirió el cierre del defecto con tres puntos de sutura, el resto de laceraciones fueron aisladas y de pequeño tamaño (1-1,5mm aprox).

- **PEA con ADASC:** conejos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12.
- **PEA sin ADASC:** conejos 2, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

#### 14.2.2 Seguimiento postquirúrgico:

➤ **Transparencia:** Se trata de una prótesis transparente y de aspecto granular que generó una opacidad central (B) grado 1 desde el momento de su implantación. En los casos que no extruyeron el implante, la transparencia se mantuvo estable durante los tres meses de seguimiento en los conejos 8, 11 y 13, sin apreciarse mayor opacificación del implante en el momento de la eutanasia (Figura 22-A). Los conejos 4 y 10 experimentaron una opacificación progresiva del implante junto con neovascularización desde el segundo mes de seguimiento, mostrando un grado 4 al tercer mes (Figura 22-B). La transparencia periférica (A) resultó intacta en todos los casos.



**Figura 22.**-Ejemplos de transparencia del implante Ref-1 (A: conejo 8 al 3º mes; B: conejo 10 al 3º mes; C: conejo 17 al 1º mes, presenta úlcera corneal sobre la prótesis) (aumento 2X).

➤ **Vascularización corneal:** La gran mayoría de los conejos desarrollaron una neovascularización periférica superior leve o moderada, de inicio generalmente dentro del primer mes de seguimiento (Figura 22-C). El conejo 8 no desarrolló neovascularización alguna

(Figura 22-A). Los conejos 4, 5, 10 y 16 mostraron una importante neovascularización central de inicio precoz (Figura 22-B). No se observó ningún caso de neovascularización corneal difusa. La vascularización corneal se originó en todos los casos a partir de neovasos superiores que infiltraban la herida quirúrgica, generalmente desde estadios precoces del postoperatorio. La neovascularización profunda fue equivalente a la superficial.

- **Cámara anterior:** Esta estructura ocular no se afectó en ningún caso.
- **Inyección conjuntival:** Obviando la inherente leve inflamación postoperatoria, sólo los conejos 3, 4 y 5 desarrollaron una inyección moderada más prolongada con resolución espontánea dentro del primer mes de seguimiento. En el resto de casos no se apreció que la prótesis indujese una inflamación ocular clínicamente relevante.
- **Superficie ocular:** Se produjeron trece casos de extrusión del implante, la gran mayoría de ellos encontrados al segundo mes de seguimiento (Figura 23-B y C) (Tabla 4). Muchos de estos conejos habían desarrollado previamente (en torno a la segunda semana) úlceras corneales centrales persistentes (Figura 23-A), de las cuales sólo la del conejo 5 mostró un infiltrado de características infecciosas. Tras la finalización del seguimiento no se objetivó ningún defecto epitelial ni úlcera en la superficie ocular de los 5 ojos con prótesis no extruidas.



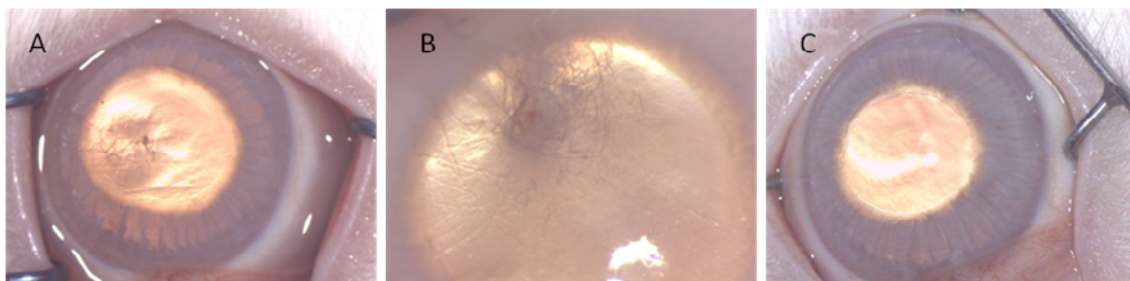
**figura 23.-** Ejemplos de extrusión del implante (aumento 2X): conejo 18 (A) tras 1 mes, presenta úlcera persistente; conejos 6 (B) y 14 (C) tras 3 meses, ambos implantes en proceso de extrusión.



Conejo	Tiempo	Úlcera previa	Conejo	Tiempo	Úlcera previa
1	2º mes	No	2	2º	No
3	2º mes	No	6	3º	No
5	3º mes	2º semana	14	3º	2º semana
7	2º mes	2º semana	15	1º	2º semana
9	2º mes	1 mes	16	2º	2º semana
12	2º mes	1 mes	17	2º	2º semana
			18	2º	1 mes

**Tabla 4.-** Casos y momento de extrusión del implante en función de la presencia (izquierda) o ausencia (derecha) de ADASC sobre la prótesis original.

A la conclusión del seguimiento, se observó que los ojos que habían sufrido previamente la extrusión del implante presentaban, en la mayoría de los casos, un leucoma central leve residual junto con cierto grado de neovascularización y sin defectos epiteliales asociados (Figura 24-A y B). En una minoría de los casos la recuperación de la superficie corneal fue completa y sin secuelas, quedando visible únicamente una imagen circular sobreelevada que se correspondía con el pocket estromal, el cual podía confundir con la presencia de una prótesis transparente (Figura 24-C).



**Figura24.-** Conejos 1 (A), 2(B) y 7 (C) al tercer mes de seguimiento tras haber sufrido previamente la extrusión del implante (aumento 2X).



No se observó anomalía alguna en ninguno de los ojos control realizados tras la conclusión del seguimiento, excepto una leve neovascularización periférica menor de 1mm limitada al área de la incisión quirúrgica.

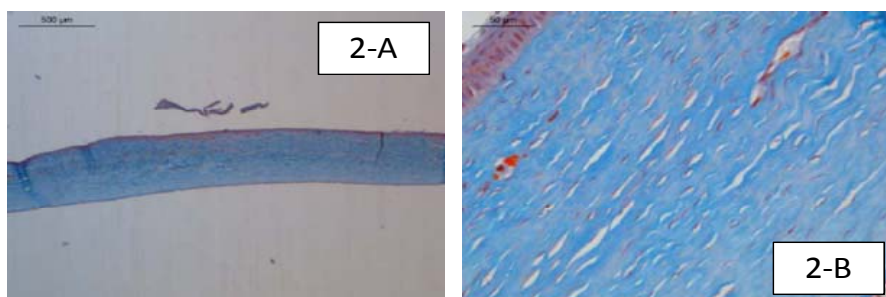
En la siguiente tabla (Tabla 5) resumimos el estado clínico de los 18 casos a estudio en el momento de la eutanasia (tercer mes de seguimiento). No encontramos diferencias significativas en la transparencia, neovascularización o tasa de extrusión en función de la presencia o ausencia de ADASC.

		Casos SIN Extrusión							
		Transparencia				Vascularización			
<b>Referencia 1 (n:18)</b>	<b>Extrusión</b>	1	2	3	4	0	1	2	3
<b>Prótesis + ADASC (n:9)</b>	<b>6</b>	2			1	1	1		1
<b>Prótesis – ADASC (n:9)</b>	<b>7</b>	1			1				2

**Tabla 5.-** Resultados clínicos de los conejos con la referencia 1 al tercer mes de seguimiento.

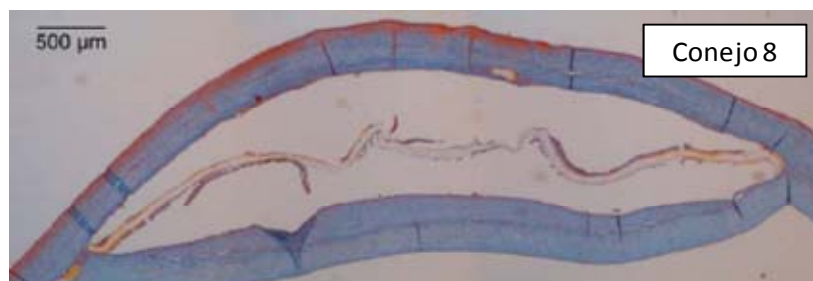
#### 14.2.3 Análisis histológico:

En las muestras controles (pocket) no se encontró ninguna alteración de la morfología corneal. En los casos extruidos no se evidenció material ni cavidad, pero fueron evidentes alteraciones residuales como la abundancia de neovasos y la existencia de macrófagos (Figura 25).



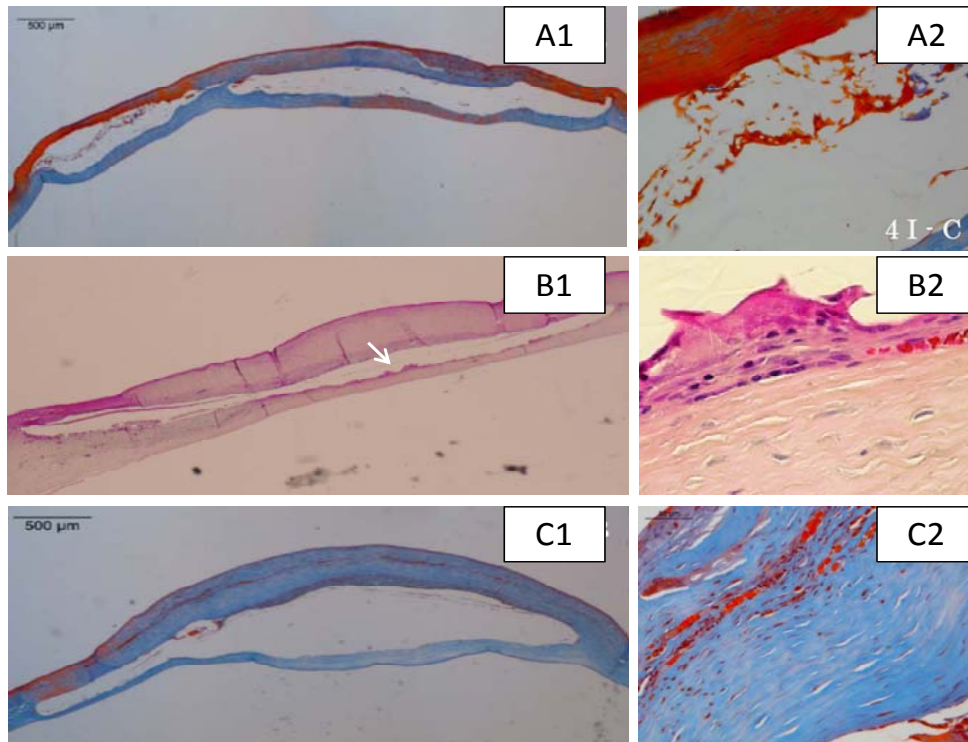
**Figura 25.-** Conejo 2: Histología corneal con Tricrómico de Masson tras extrusión del implante (2-A; 100X) al segundo mes de seguimiento. A mayor aumento (2-B; 200X) se aprecian macrófagos y neovasos residuales.

En los casos que no sufrieron la extrusión del implante se observó la presencia de un espacio ovalado en la zona central del estroma corneal (de 3,5 a 5mm de diámetro y de 0,3 a 0,6 mm de altura) que estaba parcialmente ocupado por un disco cromóforo de 100 $\mu$ m de altura (la prótesis). El biomaterial implantado fue difícil de observar por no teñirse con Hematoxilina-Eosina ni con Tricrómico de Masson, y apenas se distinguía como un material refringente que ocupaba todo el diámetro del espacio central pero sólo parte de su altura, probablemente por dehiscencia del tejido debido al procesamiento de la muestra (Figura 26).



**Figura 26.-** La prótesis ocupa solo una pequeña parte de la altura de cavidad, que se forma por dehiscencia del tejido tras el procesamiento de la muestra (aumento 100X)

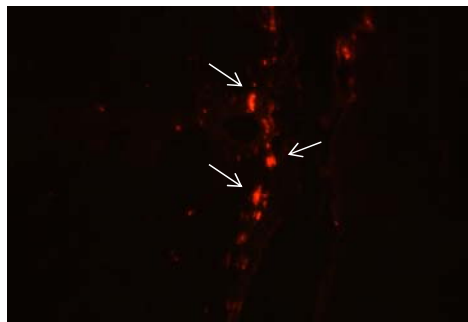
En los conejos 4 y 5 (este último en proceso de extrusión al tercer mes de seguimiento) el biomaterial implantado se encontró parcialmente invadido por células multinucleadas de tipo macrófago e incluso por vasos (Figura 27-A1 y A2). La superficie de la cavidad y del material se encontró parcialmente tapizada por células inflamatorias mono y polinucleares y algunas células gigantes de cuerpo extraño, especialmente abundantes en los vértices de la cavidad (Figura 27-B1 y B2). El estroma corneal que rodeaba la cavidad con el implante presentó un reforzamiento de tejido conjuntivo, proliferación de vasos sanguíneos (más abundantes en la mitad superior que en la inferior) y la presencia ocasional de células multinucleadas gigantes y células de aspecto espumoso (Figura 27-C1 y C2), así como áreas con abundantes células de tipo miofibroblástico (queratocitos activados).



**Figura 27.-**Conejo 4 (A1-2), biomaterial infiltrado por células inflamatorias y vasos; Conejo 10, revestimiento celular de la cavidad (B1) con células gigantes multinucleadas (flecha y B2); Conejo 6 (C1-2), presencia de neovasos y macrófagos en el estroma. (aumento A1/B1/C1 100X; A2/C2 200X; B2 400X)

#### 14.2.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil :

Los tres casos de prótesis humanizadas que no sufrieron la extrusión del implante presentaron células fuertemente positivas distribuidas alrededor del implante, aunque la cantidad de las mismas fue baja (Figura 28). No se detectaron células positivas en ninguno de los ojos control ni ojos experimentales con prótesis no celularizadas.



**Figura 28.-** Fluorescencia asociada al CM-Dil por parte de las ADASC distribuidas alrededor del implante (Ref1; las flechas señalan algunas de las células positivas) (Aumento 400X).

#### 14.2.5 Inmunohistoquímica del queratocán:

No se detectaron células claramente positivas para este marcador en ninguno de los ojos analizados.

***A la vista de estos resultados decidimos hacer un nuevo ensayo in vivo con dos nuevos PEAS, con el objetivo de evaluar si las modificaciones químicas de su estructura básica mejoran o no la supervivencia del implante. Los biomateriales seleccionados fueron:***

- ***Referencia 2*** (6 conejos: 3 PEA con células + 3 PEA sin células): *por ser el otro biomaterial que dio los mejores resultados in vitro tanto de colonización celular como de mejora con el recubrimiento de colágeno+queratán sulfato.*
- ***Referencia 4*** (6 conejos: 3 PEA con células + 3 PEA sin células): *como control negativo para confirmar que los malos resultados in vitro del resto de PEAS se correlacionan con un equivalente resultado in vivo.*

#### 14.3 Referencia 2 [Copolímero de Poli (etil acrilato-co-hidroxietil acrilato) 90/10]:

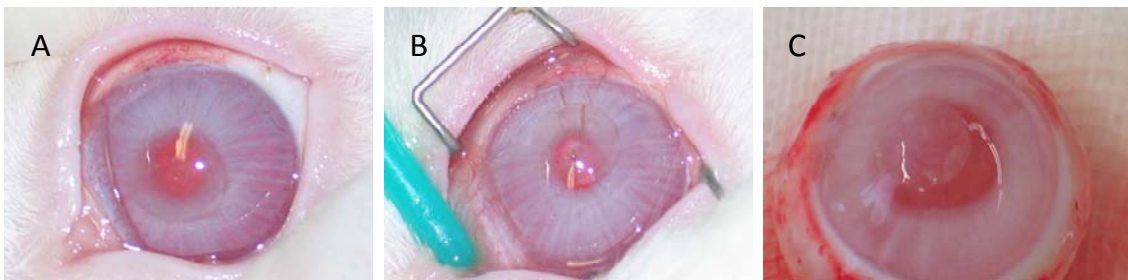
##### 14.3.1 Cirugías:

No se produjeron complicaciones quirúrgicas en ningún ojo control (pocket sin prótesis, 3 ojos) ni experimental (pocket con prótesis, 6 ojos).

- **PEA con ADASC:** conejos 2, 4 y 6.
- **PEA sin ADASC:** conejos 1, 3 y 5.

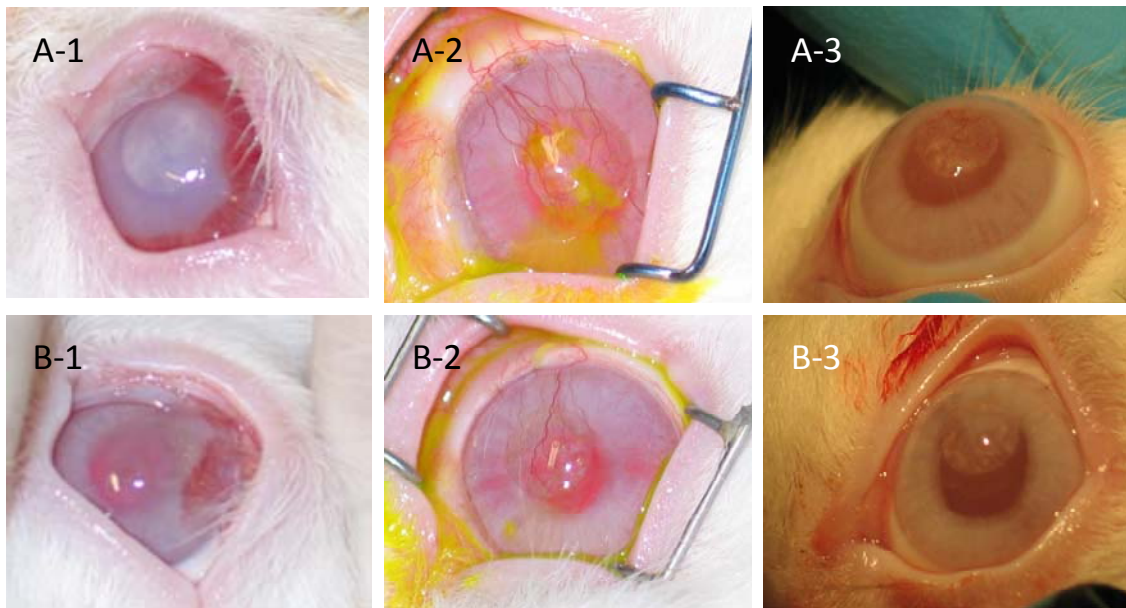
### 14.3.2 Seguimiento postquirúrgico:

➤ **Transparencia:** Se trata de una prótesis relativamente no transparente que generó una opacidad central (B) grado 3 desde el momento de su implantación. Ésta se mantuvo siempre estable durante los tres meses de seguimiento, sin apreciarse mayor opacificación del implante en el momento de la eutanasia (Figura 29). La transparencia periférica (A) resultó intacta en todos los casos excepto en uno (durante la segunda semana el conejo 4 sufrió un brote inflamatorio transitorio con edema corneal difuso moderado que se resolvió espontáneamente sin tratamiento y sin opacificación periférica residual) (Figura 30 A1-3).



**Figura 29.**-Ejemplos de transparencia del implante Referencia-2 (A: conejo 1 al 2º mes; B: conejo 5 al 3º mes; C: conejo 3 tras eutanasia) (aumento 2X).

➤ **Vascularización corneal:** Todos los conejos, excepto el número 1, desarrollaron una neovascularización periférica moderada superior entre la primera y segunda semana de seguimiento (severa periférica en el caso del conejo 4). El conejo 1 no desarrolló neovascularización alguna (Figura 29-A). Posteriormente, en el segundo mes, esta neovascularización se estabilizó con la aparición de neovasos centrales y regresión parcial de los periféricos, manteniéndose entonces sin cambios hasta el fin del seguimiento (Figura 30). La neovascularización profunda fue equivalente a la superficial.



**Figura 30.-** Ejemplos de la neovascularización corneal a la 2ª semana (1), 2º mes (2) y 3º mes de seguimiento (3) en el conejo 4 (A) y el conejo 3 (B) (aumento 2X).

- **Cámara anterior:** Esta estructura ocular no se afectó en ningún caso.
  
- **Inyección conjuntival:** Obviando la inherente leve inflamación postoperatoria, sólo un conejo (numero 4) desarrolló un episodio transitorio de inflamación significativa con inyección moderada y edema corneal asociado(Figura 30 A-1). En el resto de casos no se apreció que la prótesis indujese una inflamación ocular clínicamente relevante.
  
- **Superficie ocular:** No se produjo ningún caso de extrusión del implante, y tras la finalización del seguimiento no se objetivó ningún defecto epitelial ni úlcera en la superficie ocular de los ojos experimentales, excepto en dos casos: el conejo 5 que presentó una pequeña úlcera de 1x1mm en relación al implante, y el conejo 6 que presentaba tres áreas de defecto epitelial puntiforme.

No se observó anomalía alguna en ninguno de los ojos control realizados tras la conclusión del seguimiento, excepto una leve neovascularización periférica menor de 1mm limitada al área de la incisión quirúrgica.

En la siguiente tabla (Tabla 6) resumimos el estado clínico de los 6 casos a estudio en el momento de la eutanasia (tercer mes de seguimiento):

		Casos SIN Extrusión							
		Transparencia				Vascularización			
<b>Referencia 2 (n:6)</b>	<b>Extrusión</b>	1	2	3	4	0	1	2	3
<b>Prótesis + ADASC (n:3)</b>	<b>0</b>			3					3
<b>Prótesis – ADASC (n:3)</b>	<b>0</b>			3		1			2

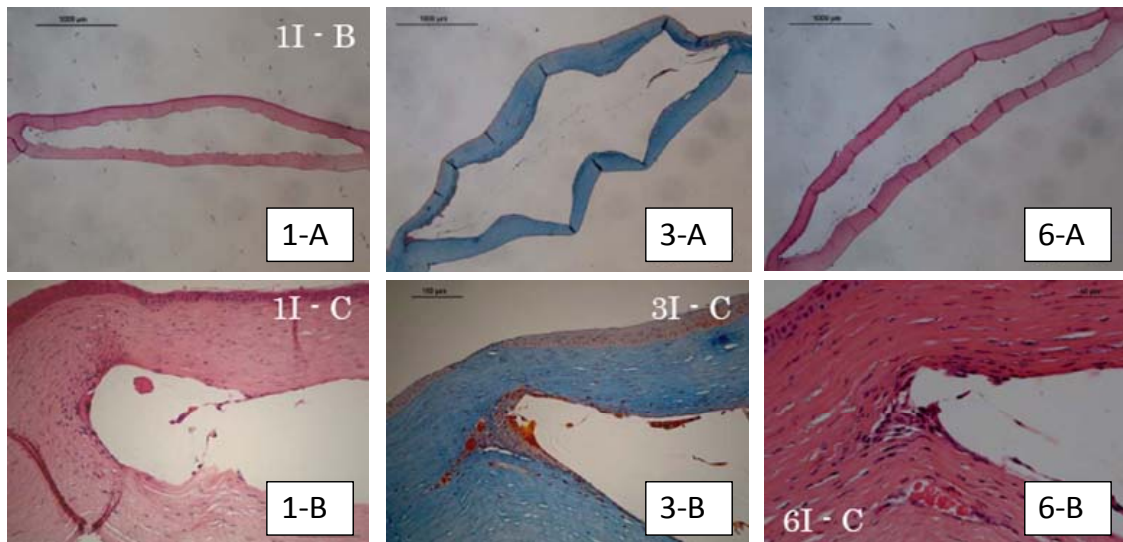
**Tabla 6.-** Resultados clínicos de los conejos con la referencia 2 al tercer mes de seguimiento.

No encontramos diferencias significativas en la transparencia, neovascularización o tasa de extrusión en función de la presencia o ausencia de ADASC. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la transparencia o vascularización de la referencia 2 con respecto a las otras dos prótesis ensayadas. Encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p: 0,007$ ) entre la tasa de extrusión de las referencias 1 y 2 (72,22% y 0% respectivamente).

#### 14.3.3 Análisis histológico:

Se observó una reacción moderada de carácter macrofágico alrededor del implante además de la existencia de una interfase entre el material implantado y los tejidos corneales del conejo, compuesta de una franja de tejido conjuntivo denso que rodeaba el implante con la presencia ocasional de un infiltrado inflamatorio y un proceso moderado de neovascularización (Figura 31). La presencia de celularidad anidada en el interior del implante fue excepcional.

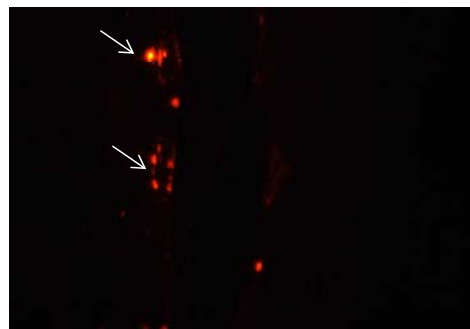




**Figura 31.-** Imagen histológica (A) tras tinción con hematoxilina-eosina (conejos 1 y 6) y tricrómico de Masson (conejo 3) (aumento 100X). A mayor aumento (B) se observa como la reacción macrofágica es más abundante en los ángulos del implante (aumento 200X).

#### 14.3.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil:

Los tres casos de prótesis humanizadas presentaron células fuertemente positivas distribuidas alrededor del implante, aunque la cantidad de las mismas fue baja (Figura 32). No se detectaron células positivas en ninguno de los ojos control ni ojos experimentales con prótesis no celularizadas.



**Figura 32.-** Fluorescencia asociada al CM-Dil por parte de las ADASC distribuidas alrededor del implante (Ref2; las flechas señalan algunas de las células positivas) (aumento 400X).

#### 14.3.5 Inmunohistoquímica del queratocán:

No se detectaron células claramente positivas para este marcador.



#### 14.4 Referencia 4 [Copolímero de Poli (etil acrilato-co-ácido acrílico) 90/10]:

##### 14.4.1 Cirugías:

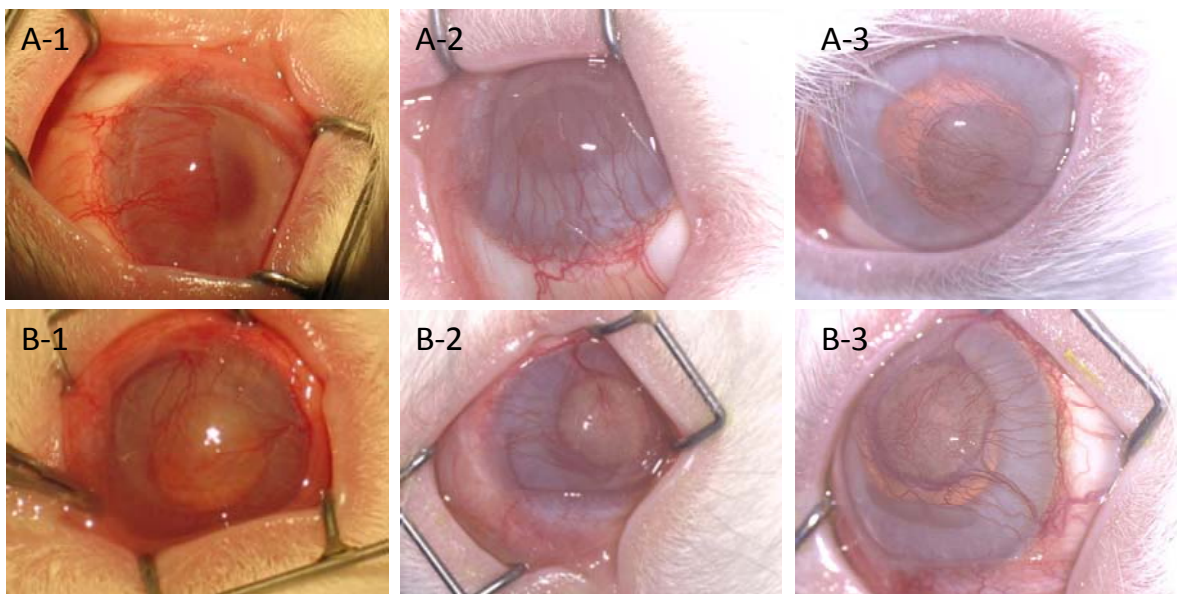
Se realizaron 3 ojos control (pocket sin prótesis) y 6 ojos experimentales (pocket con prótesis). Se produjeron dos casos de perforación posterior hacia cámara anterior (ojos control de conejos 3 y 4), un caso de laceración anterior del pocket (ojo experimental del conejo 3) y un caso de desgarro de la prótesis de 1mm durante la introducción y manipulación de la misma dentro del pocket (ojo experimental del conejo 2).

- **PEA con ADASC:** conejos 1, 2 y 3.
- **PEA sin ADASC:** conejos 4, 5 y 6.

##### 14.4.2 Seguimiento postquirúrgico:

➤ **Transparencia:** Se trata de una prótesis parcialmente transparente que generó una opacidad central (B) grado 2 desde el momento de su implantación. Asociado a la aparición precoz de una fuerte inflamación, la prótesis se hizo progresivamente más opaca, alcanzando un grado 3 (opacidad moderada) ya tras la primera semana de seguimiento. En los casos que no extruyeron la prótesis, ésta se hizo totalmente opaca (grado 4+) a partir del segundo mes de seguimiento, imposibilitando la visualización de cualquier estructura intraocular central (Figura 33). En el conejo 2 se pudo observar un depósito cristalóide intraestromal alrededor del implante y en relación con los neovasos circundantes, compatible clínicamente con una queratopatía lipídica. La transparencia periférica (A) resultó intacta en todos los casos.

➤ **Vascularización corneal:** Todos los conejos iniciaron una fuerte neovascularización periférica superior tras la primera semana de seguimiento, que una semana después ya era severa y afectaba al centro de la prótesis (grado 3). En los casos que no sufrieron la extrusión del implante, esta neovascularización acabó afectando a gran parte del área corneal y con carácter severo (grado 3+) (Figura 33). La neovascularización profunda fue equivalente a la superficial.



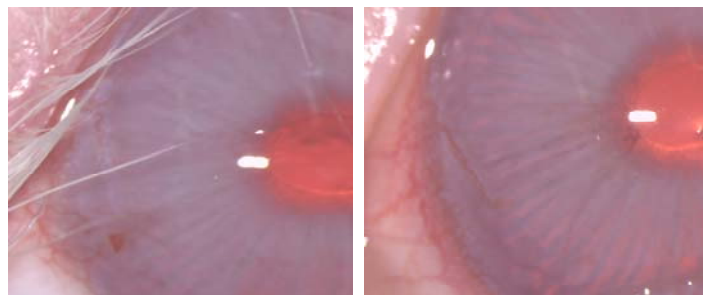
**Figura 33.-** Ejemplos de la progresión de la transparencia y vascularización corneales a la 2ª semana (1), 2º mes (2) y 3º mes de seguimiento (3) en los conejos 1 (A) y 5 (B) (aumento 2X).

➤ **Cámara anterior:** Esta estructura ocular no se afectó en ningún caso.

➤ **Inyección conjuntival:** Tras el acto quirúrgico y durante los dos primeros meses de seguimiento la prótesis indujo una importante inflamación de la superficie ocular, con inyección moderada y difusa en todos los casos (excepto en el conejo 5 que fue severa). Esta inyección se observó resuelta en todos los casos al tercer mes de seguimiento (excepto en el conejo 5 que seguía siendo persistente) (Figura 33).

➤ **Superficie ocular:** Se produjeron tres casos de extrusión del implante: conejo 3 (al segundo mes), conejo 4 (al segundo mes) y conejo 6 (al tercer mes de observación). Tras la finalización del seguimiento no se objetivó ningún defecto epitelial ni úlcera en la superficie ocular de los tres ojos con prótesis no extruidas, aunque se observó que el implante producía una fuerte elevación del área corneal central con respecto al resto de la superficie ocular.

En los ojos control realizados se observó, a la conclusión del seguimiento, una neovascularización periférica leve de 1,5mm aproximadamente limitada al área de la incisión quirúrgica (Figura 34).



**Figura 34.-** Ejemplos de la leve neovascularización periférica, limitada al sector de la incisión quirúrgica, encontrada en los ojos control (aumento 2X). Conejo 1 (izquierda) y conejo 4 (derecha).

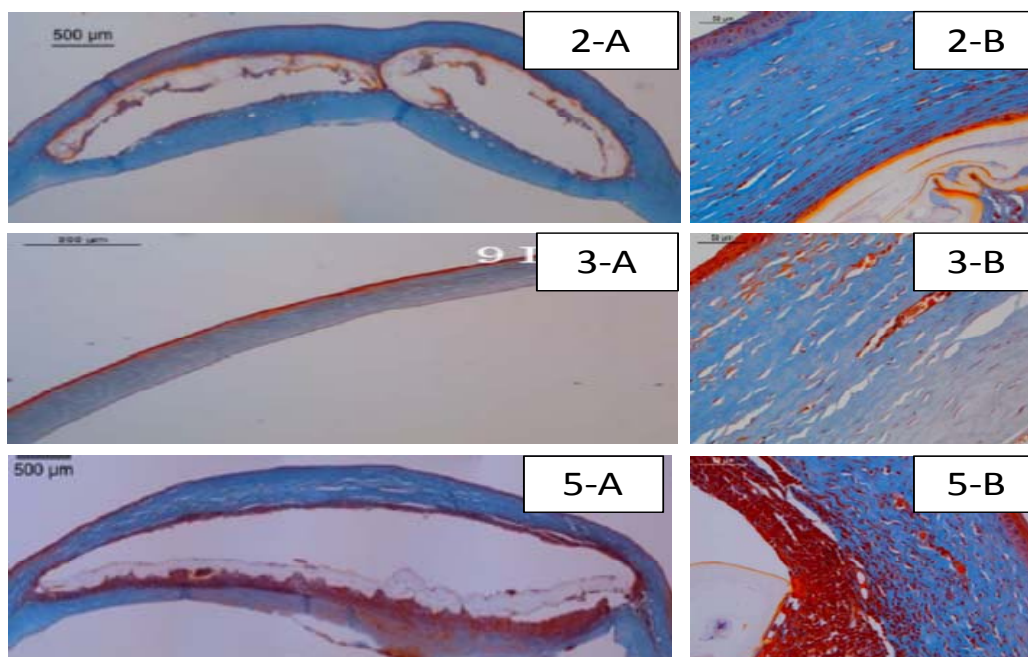
En la siguiente tabla (Tabla 7) resumimos el estado clínico de los 6 casos a estudio en el momento de la eutanasia (tercer mes de seguimiento). No encontramos diferencias significativas en la transparencia, neovascularización o tasa de extrusión en función de la presencia o ausencia de ADASC. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la transparencia, vascularización o tasa de extrusión (50%) de la referencia 4 con respecto a las otras dos prótesis ensayadas.

		Casos SIN Extrusión							
		Transparencia				Vascularización			
<i>Referencia 4 (n:6)</i>	Extrusión	1	2	3	4	0	1	2	3
Prótesis + ADASC (n:3)	1				2				2
Prótesis – ADASC (n:3)	2				1				1

**Tabla 7.-** Resultados clínicos de los conejos con la referencia 4 al tercer mes de seguimiento.

#### 14.4.3 Análisis histológico:

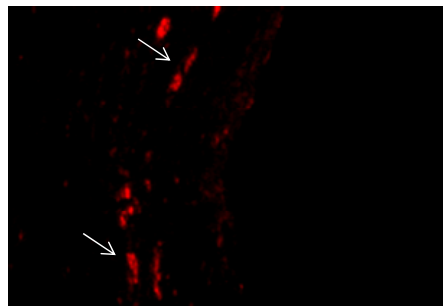
En los casos extruidos no se evidenció material ni cavidad. En el estroma eran evidentes alteraciones residuales como la abundancia de vasos y la existencia de macrófagos. En los casos que no sufrieron la extrusión del implante se observó que el material aparecía rodeado de una respuesta macrofágica, más abundante en los ángulos de la cavidad. En el estroma, y a cierta distancia del material, esta respuesta defensiva macrofágica también fue evidente, si bien en menor cuantía. El estroma corneal de alrededor de la prótesis mostró una vascularización en todas las muestras (Figura 35). En uno de los casos se observó además la presencia de un infiltrado inflamatorio agudo y una intensa hemorragia (conejo 11).



**Figura 35.-** Imagen histológica (A; 100X) de los conejos 2,3 y 5 tras tinción con tricrómico de Masson. Obsérvese como el conejo 3 presenta una recuperación parcial de la arquitectura tras la extrusión del implante. A mayor aumento (B; 200X) se observa la reacción macrofágica alrededor del implante (2-B) y residual tras la extrusión (3-B). Gran componente inflamatorio y extravasación de hematíes en el conejo 5 (5-B).

#### 14.4.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil:

Los dos casos de prótesis humanizadas que no sufrieron la extrusión del implante presentaron células fuertemente positivas distribuidas alrededor del implante, aunque la cantidad de las mismas fue baja (Figura 36). No se detectaron células positivas en ninguno de los ojos control ni ojos experimentales con prótesis no celularizadas.



**Figura 36.-** Fluorescencia asociada al CM-Dil por parte de las ADASC distribuidas alrededor del implante (Ref4; las flechas señalan algunas de las células positivas) (aumento 400X).

#### 14.4.5 Inmunohistoquímica del queratocán:

No se detectaron células claramente positivas para este marcador.

## 15. Lámina de córnea humana descelularizada: estudios *in vivo* sobre modelo animal:

### *15.1 Cirugías:*

Se realizaron 12 ojos control (pocket sin lámina) y 18 ojos experimentales (pocket con lámina). Se produjo un caso de perforación posterior hacia cámara anterior (ojo control del conejo 18) y cinco casos de laceración anterior del pocket (ojo experimental de los conejos 1-2 y ojo control de los conejos 4, 7 y 9). Estas laceraciones fueron aisladas y de pequeño tamaño (1-1,5mm aprox).

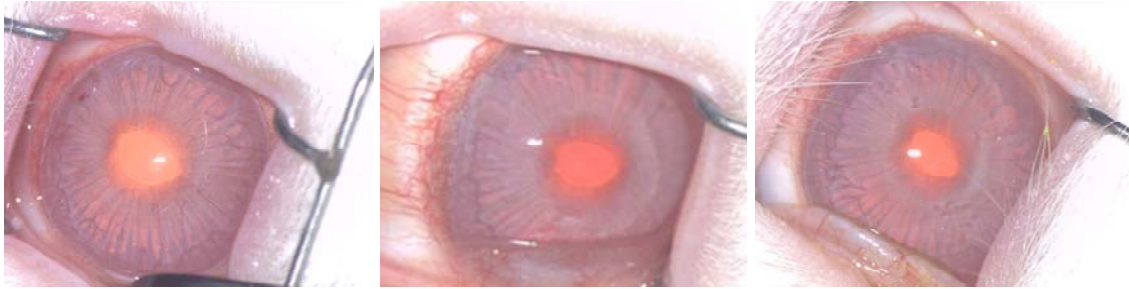
- **PEA con ADASC:** conejos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.
- **PEA sin ADASC:** conejos 1, 2, 5, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

### *15.2 Seguimiento postquirúrgico:*

Se trata de una prótesis totalmente transparente, más flexible y plegable que las prótesis sintéticas de PEA, que generó una opacidad central (B) grado 0 (prótesis transparente casi invisible) desde el momento de su implantación. Ésta se mantuvo siempre estable durante los tres meses de seguimiento en la gran mayoría de los casos, sin apreciarse mayor opacificación del implante en el momento de la eutanasia. La transparencia periférica (A) resultó intacta en todos.

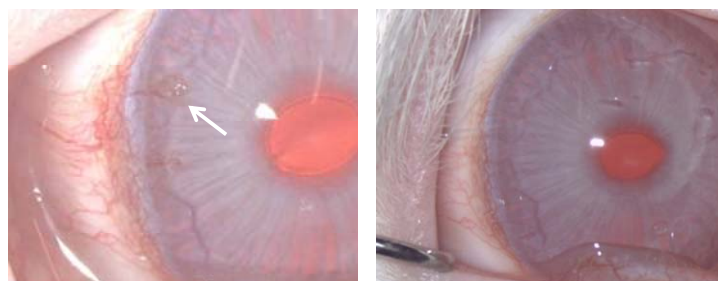
Para describir más fácilmente la evolución de la transparencia, neovascularización e inyección de los ojos experimentales *in vivo*, es posible subdividir todos los casos en dos subgrupos evolutivos:

➤ **Grupo 1:** A este grupo pertenecen la gran mayoría de los casos (todos menos los 5 ojos experimentales del grupo 2). En ellos la prótesis se mantuvo totalmente transparente durante los 3 meses de seguimiento, siendo prácticamente imperceptible clínicamente excepto por una muy sutil sobreelevación del estroma en los bordes de la lámina (Figura 37).



**Figura 37.-** Ejemplo de la evolución de la transparencia de la lámina (conejo 8): 1ª semana (izquierda), 1º mes (centro), 3º mes (derecha) (aumento 2X).

En la mayoría de estos casos se produjo una neovascularización periférica superior precoz muy leve (<1mm) limitada a la incisión quirúrgica y en clara relación con la sutura. Tras la eliminación de la misma se observó una regresión progresiva de estos neovasos hasta su completa desaparición al tercer mes (N0) (Figura 38). Como veremos más adelante, este patrón de neovascularización también se encontró en los ojos controles (pocket).



**Figura 38.-** Ejemplo de la evolución de la neovascularización corneal (conejo 10): 1º mes (izquierda), 2º mes (derecha). Obsérvese la regresión completa de los neovasos corneales (aumento 2X).



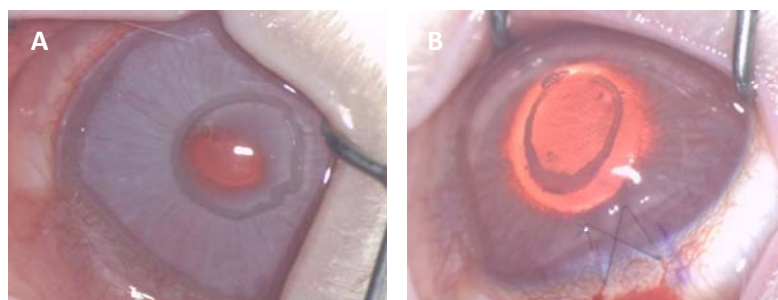
En una minoría de los casos (conejos 9, 11 y 12) esta neovascularización fue inicialmente algo más extensa (2-3mm), y aunque también se observó la regresión progresiva de estos vasos, persistió una leve neovascularización periférica superior (siempre desde la incisión quirúrgica) tras la conclusión del seguimiento (N1) (Figura 39).



**Figura 39.-** Ejemplo de la evolución de la neovascularización corneal (conejo 9): 1ª semana (izquierda), 1º mes (centro), 2º mes (derecha) (aumento 2X).

No se observó inflamación alguna de la superficie ocular asociada al implante en ninguno de los casos de este grupo.

Las láminas que se emplearon en los tres últimos conejos del ensayo (16, 17 y 18) presentaron la peculiaridad de tener un reborde blanquecino opaco 360º (Figura 40), así como una rigidez aumentada y una transparencia central intacta excepto en la lámina del conejo 17 que era parcialmente opaca (manteniéndose sin cambios durante el seguimiento). La única diferencia de estas láminas con respecto a las demás es que estuvieron 2 meses más en medio de cultivo y refrigeración esperando a ser celularizadas desde el momento de su adquisición.

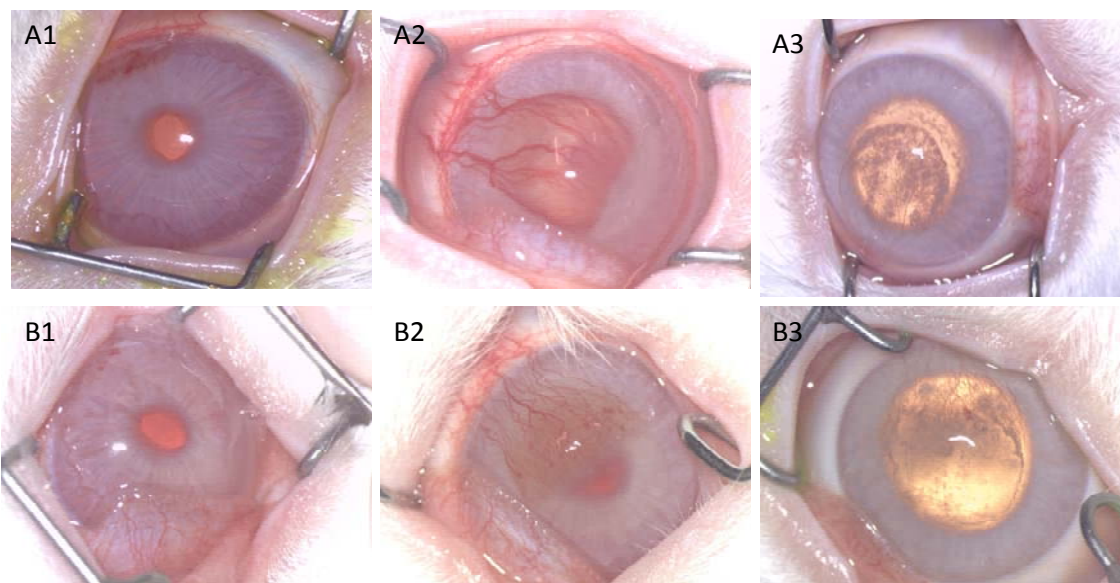


**Figura 40.-** Postoperatorio inmediato de los conejos 16 (A) y 18 (B) (aumento 2X).



- **Grupo 2:** A este grupo pertenecen una minoría de casos (conejos 3, 6, 7, 13 y 18).

Estos ojos se caracterizaron por presentar un cuadro de queratitis estromal dentro del primer mes de seguimiento tras un postoperatorio inmediato correcto. Durante la fase aguda del proceso apareció una neovascularización progresiva moderada-severa con afectación central, inyección conjuntival moderada y un edema estromal difuso central. Después de alcanzar su máximo grado dentro de los dos primeros meses de seguimiento se observó una mejoría espontánea en ausencia de tratamiento, mostrando al tercer mes una resolución completa del edema corneal con un leucoma residual que produjo una opacidad central moderada (T3). La neovascularización también experimentó una regresión parcial (Figura 41).



**Figura 41.-** Ejemplos de queratitis estromal: seguimiento de los conejos 3 (A) y 6 (B) a la 2ª semana (1), 1º mes (2) y 3º mes (3) (aumento 2X).

Mientras que las láminas de los conejos 3 y 18 no presentaron ninguna peculiaridad en el momento de su implantación, en los conejos 6 y 7 se observó que sus láminas contenían unos gránulos marrones adheridos a ambas superficies de la lámina, los cuales se retiraron parcialmente con hemosteta antes de su implantación. Estos depósitos no se presentaron en ningún otro caso, y aunque el conejo 7 presentó posteriormente una infección de la sutura que

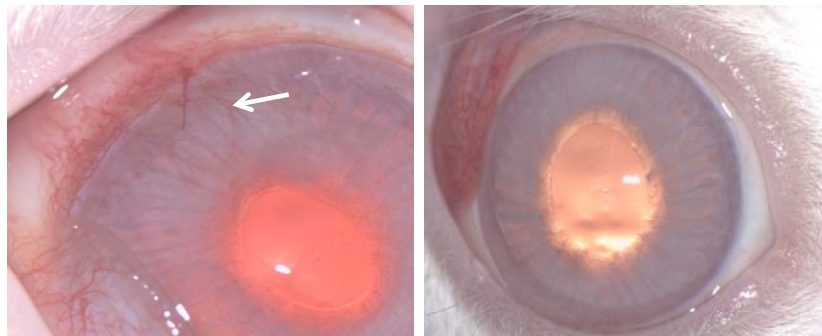
inició la queratitis estromal, no pudimos demostrar su origen infeccioso mediante cultivo, resultando incierta su composición. La lámina del conejo 18, además de presentar las alteraciones ya descritas en el apartado anterior, poseía una morfología ovoide atípica (Figura 40-B).

➤ **Cámara anterior:** Esta estructura ocular no se afectó en ningún caso.

➤ **Superficie ocular:** No se produjo ningún caso de defecto epitelial, úlcera o

extrusión del implante en los tres meses de seguimiento.

No se observó anomalía alguna en ninguno de los ojos control realizados tras la conclusión del seguimiento, excepto una leve neovascularización periférica de inicio precoz, generalmente menor de 1mm, limitada al área de la incisión quirúrgica y con resolución progresiva a lo largo del seguimiento (Figura 42).



**Figura 42.-** Conejo 12: neovascularización periférica precoz del pocket control (izq) con regresión completa al tercer mes (derecha) (aumento 2X).

En la siguiente tabla (Tabla 8) resumimos el estado clínico de los 18 casos a estudio en el momento de la eutanasia (tercer mes de seguimiento). Las diferencias en la tasa de extrusión,

transparencia ( $p:0,340$ ) y vascularización ( $p: 0,800$ ) entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas.

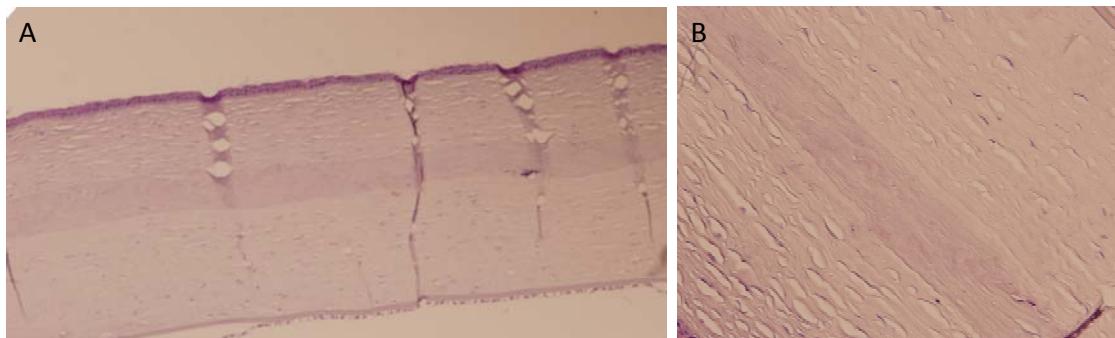
		Casos SIN Extrusión								
		Transparencia					Vascularización			
<i>Lámina descel (n:18)</i>	Extrusión	0	1	2	3	4	0	1	2	3
Lámina + ADASC (n:9)	0	7			2		5	2		2
Lámina – ADASC (n:9)	0	5	1		2	1	6		1	2

**Tabla 8.-** Resultados clínicos de los conejos con láminas al tercer mes de seguimiento.

### 15.3 Análisis histológico:

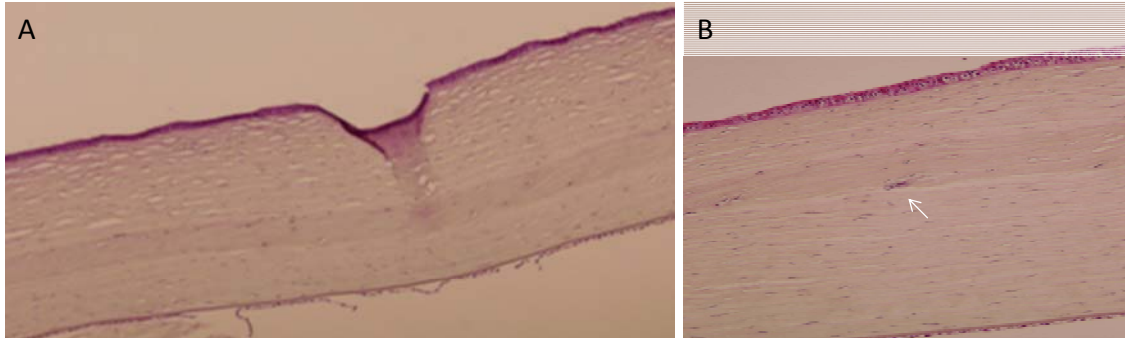
Los grupos clínicos 1 y 2 previamente descritos presentaron, además de una evolución clínica diferente, unos patrones histológicos claramente diferenciados:

➤ **Grupo 1:** Como ya hemos comentado a este grupo pertenecen la gran mayoría de los casos realizados. Se caracterizan por la presencia, en la porción media del estroma, de una banda densa de colágeno, de bordes definidos y espesor homogéneo que no se acompaña de inflamación, neovascularización ni depósito de cristales a su alrededor (Figura 43). Ocasionalmente se encuentran queratocitos activados en el estroma circundante.



**Figura 43.-** Conejo 1 (sin ADASC): tinción con hematoxilina-eosina. Banda acelular densa y homogénea de colágeno sin ningún signo inflamatorio asociado (aumento A:100X; B:200X).

Mientras que esta banda se encontró acelular en los conejos que portaban láminas sin ADASC, en aquellos que portaban láminas con ADASC se observó una banda de colágeno generalmente hipocelular con la presencia de células aisladas de morfología estrellada alrededor y en el interior de la lámina, compatibles con las ADASC en proceso de diferenciación a queratocitos (Figura 44).

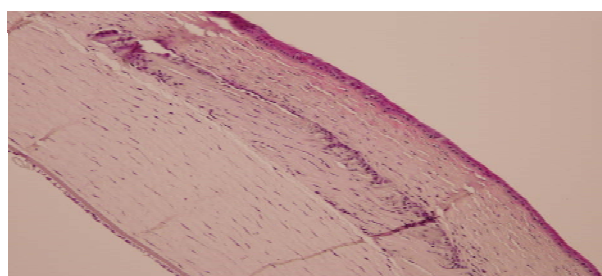


**Figura 44.-** Conejo 10 (A) y 11 (B) (con ADASC): tinción con hematoxilina-eosina. Banda hipocelular densa y homogénea de colágeno sin ningún signo inflamatorio asociado (A; 100X). En algunos casos (B; 100X) se pudo detectar alguna célula inflamatoria aislada (flecha).

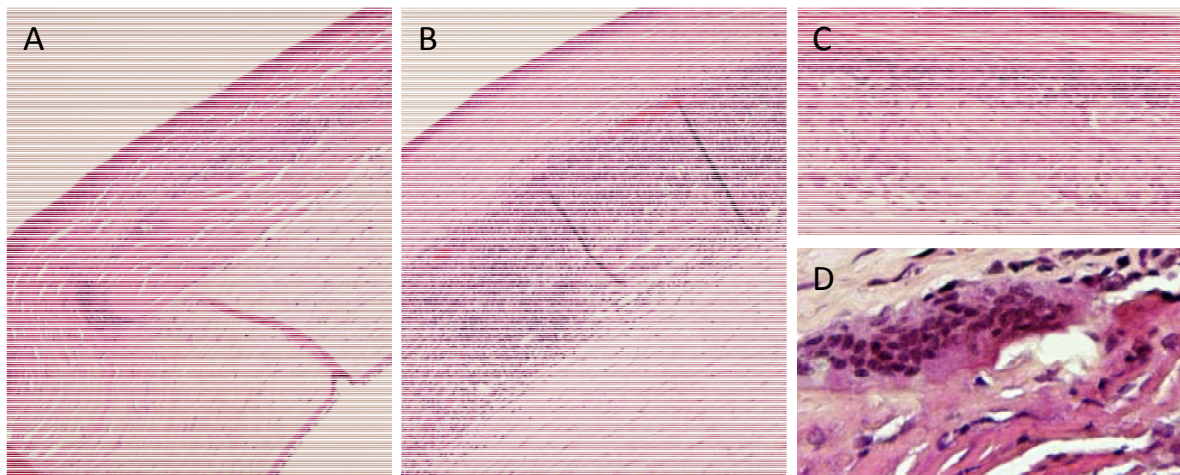
Como hemos comentado, en la mayoría de los casos de este grupo no se encontró ningún signo de inflamación ni neovascularización (Conejos 1, 2, 4, 5, 10, 16) asociados al implante, aunque en algunos casos (conejos 11, 12, 14, 15 y 17) se pudo observar una escasa y muy leve reacción inflamatoria linfocítica (células aisladas) limitada a los extremos de la lámina, persistiendo el resto de su superficie libre de cualquier reacción inflamatoria (Figura 44-B).

Los conejos 8 y 9, que clínicamente habían mostrado una evolución muy favorable sin incidencias, en su histología se observó una reacción inflamatoria linfocítica moderada alrededor del implante con aisladas células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño junto con leve edema y neovascularización (Figura 45).

**Figura 45.-** Conejo 8: reacción inflamatoria linfocítica alrededor del implante. Abundantes ADASC en el interior de la lámina con morfología estrellada (aumento 100X).



**Grupo 2:** Estos conejos (3, 6, 7, 13 y 18) experimentaron un cuadro de queratitis estromal durante el seguimiento, lo que se correlacionó con el desfavorable patrón histológico encontrado en estos casos. Este grupo se caracterizó por la presencia de una severa reacción inflamatoria linfohistiocítica con células gigantes de cuerpo extraño fagocitando el material laminar, neovascularización extensa y edema (Figura 46).



**Figura 46.-** Conejos 1 (A) y 2 (B, C, D). Severa reacción inflamatoria linfohistiocítica en relación a la lámina (A y B; 100X), que es parcialmente digerida (C; 200X). Presencia de células gigantes de cuerpo extraño (D; 400X).

El único caso de este grupo que mostró un patrón diferenciado fue el conejo 3, donde se encontró una lámina acelular delgada y discontinua (posiblemente por digestión previa), pero sin hallarse reacción inflamatoria ni neovascularización asociadas.

En la siguiente tabla (Tabla 9) resumimos los patrones histológicos de reacción inflamatoria encontrados en función de la presencia o ausencia de ADASC en la lámina implantada. Las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ( $p: 0,547$ ).

<i>Lámina descel (n:18)</i>	<b>Infiltrado inflamatorio tisular</b>				
	<i>Nulo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Leve</i>	<i>Moderado</i>	<i>Severo</i>
<b>Lámina + ADASC (n:9)</b>	3	2	0	2	2
<b>Lámina – ADASC (n:9)</b>	4	3	0	0	2

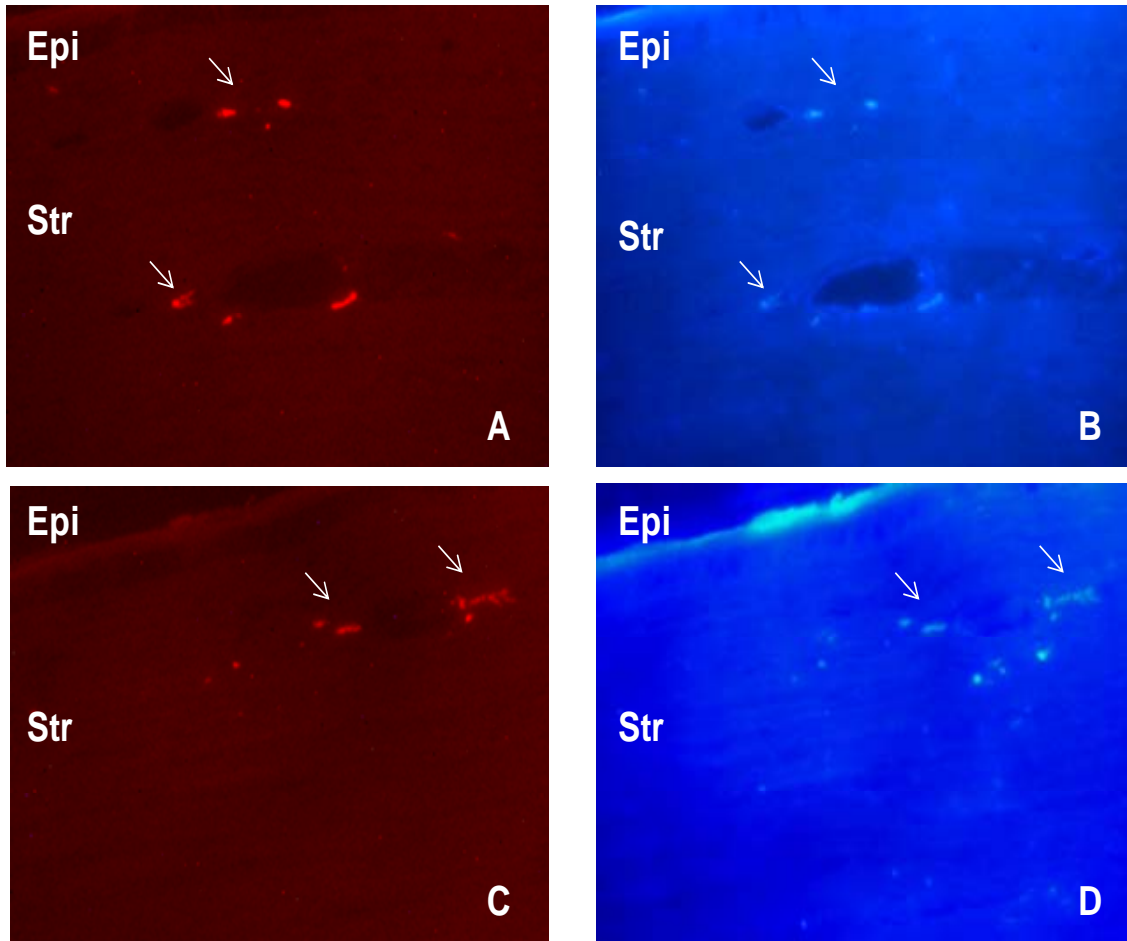
**Tabla 9.-** Infiltrado inflamatorio tisular en función de la presencia o no de ADASC.

#### 15.4 Fluorescencia con Vybrant CM-Dil + IHQ del queratocán:

Para evaluar si la hipocelularidad observada en la histología de las córneas con láminas recelularizadas estaba compuesta realmente de ADASC humanas y no de células inflamatorias o queratocitos del huésped infiltrando el implante, analizamos la fluorescencia del Vybrant CM-Dil. Se detectaron células fuertemente positivas alrededor y en el interior del implante en los nueve casos que recibieron láminas recelularizadas. La cantidad de células positivas fue baja, confirmando la hipocelularidad y el origen humano de las células vistas en la histología (Figura 47). El Vybrant CM-Dil no fue detectado en ninguna de las córneas control o experimentales con láminas no recelularizadas implantadas.

Además, se detectó la expresión de queratocán humano por parte de las células trasplantadas en los nueve casos que las contenían, confirmando la diferenciación de las ADASC hacia queratocitos humanos. Como se puede observar en la Figura 47, el queratocán sólo fue expresado por células positivas para el Vybrant CM-Dil (humanas) pero no por la totalidad de las mismas. No se detectó expresión alguna de queratocán en ninguna de las córneas control o experimentales con láminas no recelularizadas implantadas.





**Figura 47.-** Fluorescencia de las células humanas teñidas con CM-Dil alrededor y en el interior del implante (A,C) y su expresión de queratocán humano (B,D) (magnificación, 400X), confirmando la presencia de células humanas supervivientes dentro del estroma y su diferenciación hacia queratocitos humanos. Se muestran las mismas secciones (A-B, C-D), reflejando que sólo las células teñidas con CM-Dil expresan también queratocán. Abreviaturas: Epi: epitelio; Str: estroma.

*15.5 Comparativa clínica: Láminas descularizadas versus Membranas macroporosas de PEA:*

Las diferencias en transparencia, vascularización y tasa de extrusión entre las láminas de estroma corneal humano descularizado y las membranas macroporosas de PEA consideradas en su conjunto fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,005$ ). En la siguiente tabla (Tabla 10) se exponen los resultados clínicos (expresados en porcentaje) obtenidos *in vivo* con cada uno de los dos tipos de implantes evaluados en este estudio, independientemente de la presencia o ausencia de células madre.

		Casos SIN Extrusión									
		Transparencia					Vascularización				
	Extrusión	0	1	2	3	4	0	1	2	3	
Láminas desccl (n:18)	0	67	6	0	22	5	61	11	6	22	
Membranas PEA (n:30)	53	0	21	0	43	36	14	7	0	79	

**Tabla 10.**-Comparación del pronóstico clínico obtenido *in vivo* con las láminas descularizadas y las membranas macroporosas de PEA consideradas en su conjunto, independientemente de la presencia o ausencia de ADASC. Valores expresados en porcentaje.



# *Discusión*

---

En el presente estudio hemos estudiado la biointegración de diferentes injertos, compuestos de membranas macroporosas de poliacrilato de etilo o láminas de estroma corneal humano descelularizado, cuando son implantados *in vivo* dentro del estroma corneal del conejo New Zealand. Además hemos analizado la supervivencia y capacidad de diferenciación queratocítica de las células madre humanas derivadas del lipoaspirado procesado (ADASC) cuando se encuentran colonizando estos injertos *in vivo*, además de su influencia sobre la biointegración de los mismos. Para ello se han empleado técnicas de biología celular y molecular, inmunohistoquímica, microscopía óptica y de fluorescencia.

La importancia de incluir un componente celular en estos injertos se debe a que, como ya hemos comentado, los queratocitos son esenciales para el remodelado del estroma, pues producen factores como colágeno, proteoglicanos y metaloproteinasas, los cuales son esenciales para el mantenimiento de la transparencia corneal a largo plazo. Además los queratocitos producen mediadores paracrinos que regulan la proliferación, motilidad, diferenciación y posiblemente otras funciones del epitelio corneal (Liu y cols., 1999). Todo esto recalca la necesidad de trasplantar un sustituto celular junto con el injerto (soporte estructural) para llevar a cabo estas funciones críticas en la homeostasis corneal. Las células corneales estromales humanas (queratocitos y células madre estromales), como ya se ha comentado en la introducción, presentan grandes inconvenientes que dificultan su aplicación en la práctica clínica e imposibilitan su aplicación autóloga (daño del tejido donante, baja cantidad de células y subcultivos ineficientes), obligándonos a buscar una fuente extraocular de células madre para su aplicación en la terapia regenerativa del estroma corneal. Hasta la fecha se han ensayado diferentes tipos de células madre extraoculares en el estroma: células madre derivadas de la médula ósea (BM-MSC), del tejido adiposo (ADASC), del cordón umbilical (UMSC), y células madre embrionarias (ESC) (Arnalich y cols., 2008; Liu y cols., 2010 y 2012; Chan y cols., 2013). En nuestro estudio decidimos optar por las ADASC humanas para repoblar nuestros injertos pues han demostrado ser una fuente óptima de células madre para

el desarrollo de la ingeniería tisular corneal, pues evitan las limitaciones existentes con las células corneales y poseen un gran potencial autólogo (no disponible con las UMSC y ESC), además de una extracción sencilla (al contrario que las BM-MSK) y celularmente eficiente.

## **16. Membranas macroporosas de Polietil Acrilato (PEA)**

Nuestro primer objetivo fue evaluar, *in vitro* e *in vivo*, las membranas de PEA como posible scaffold para futuras y optimizadas queratoprótesis que puedan evitar, o al menos reducir, la alta tasa de complicaciones asociadas con las opciones actuales, las cuales emplean polimetil metacrilato (PMMA) o poli-2-hidroxietil metacrilato (pHEMA) para sus scaffolds (Jiraskova y cols., 2011; Aldave y cols., 2012).

El punto de cristalización del PEA se encuentra muy por debajo de la temperatura corporal, asegurando que el material se encuentre siempre en estado gomoso, y por tanto moldeable y flexible, con unas propiedades mecánicas similares a las del estroma corneal. Sin embargo, el PEA es un material algo hidrófobo, lo cual hace que surjan dudas en torno a su comportamiento dentro del estroma corneal y la posibilidad de la ulceración de este último debido a la fricción generada entre el implante y el tejido circundante. Este hecho podría explicar la alta tasa de úlceras corneales e implantes extruidos (72,2%) observada en los casos en los que el PEA original, sin modificaciones químicas (Referencia 1-PEA), fue implantado. Por tanto, estas extrusiones no se deberían directamente a un “melting” corneal de mecanismo inflamatorio inducido por el implante. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que las membranas de PEA no generaron una inflamación clínicamente relevante tras su implantación, cosa que si se observó durante el postoperatorio de los ojos que recibieron la Referencia 4 (PEA-AAc10; adición de un 10% de grupos Ácido Acrílico al PEA). Los hallazgos histológicos de los casos no extruidos con membranas PEA (Ref.1) también apoyan esta teoría pues muestran

únicamente una moderada respuesta macrofágica con aisladas células gigantes de cuerpo extraño, pero no una verdadera digestión del tejido adyacente, localizándose este tejido inflamatorio principalmente en los bordes de la membrana, sugiriendo la existencia de fricción en estas áreas.

Las membranas de PEA mostraron una respuesta favorable a la adsorción de proteínas en su superficie. Estas proteínas exhiben ligandos de adhesión que teóricamente deberían incrementar la colonización celular de las membranas macroporosas de PEA. Sin embargo, nosotros hemos podido demostrar una mejoría en la colonización de las ADASC únicamente con el recubrimiento de colágeno + queratán sulfato. Los recubrimientos de fibronectina, péptido FN7-10 y colágeno aislado no demostraron mejorar significativamente la colonización celular cuando se los comparó con el material desnudo sin recubrimiento.

La adición de unidades hidrofílicas al PEA parece jugar un papel importante en su integración dentro del estroma corneal. Dos tipos de unidades hidrofílicas han sido consideradas en este estudio: el hidroxietil acrilato (HEA) introduce grupos hidroxilo en la superficie del material, mientras que los ácidos acrílico (AAc) y metacrílico (MAAc) introducen grupos carboxilo. La adición de grupos carboxilo a la superficie de queratoprótesis ha sido previamente evaluada, demostrando un incremento significativo de la adherencia de las mismas al tejido corneal (Von Fischner y cols., 1999; Kompa y cols., 2000). Además, la presencia de grupos carboxilo teóricamente ayuda a la inmovilización del colágeno en la superficie mediante enlaces covalentes. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la colonización celular disminuye con la alta hidrofiliidad (20%; Referencias 3, 6 y 7), sobre todo cuando ésta procede de grupos AAc (Referencia 6) o MAAc (Referencia 7), y permanece excelente con la baja hidroxidad del PEA (10%; Referencias 2, 4 y 5), aunque sin diferencias significativas con respecto el PEA original sin adiciones (Referencia 1) (Figura 11).

Para nuestro ensayo *in vivo* decidimos implantar, además del PEA no modificado o virgen (Referencia 1), los dos copolímeros que contenían la menor cantidad (10%) de HEA (Referencia 2) y AAc (Referencia 4) ya que estos biomateriales mostraron una buena colonización celular *in vitro* junto con unas óptimas propiedades biofísicas. Los copolímeros que contenían ácido metacrílico fueron descartados pues se trataban de biomateriales opacos, no estables biofísicamente, y menos flexibles que el resto. En los grupos de las referencias 2 y 4 sólo realizamos 6 casos pues este tamaño muestral resultó ser suficiente para demostrar diferencias estadísticamente significativas en la tasa de extrusión entre la referencia 1 (72,22%) y la referencia 2 (0%), y no diferencias significativas entre la referencia 1 y la 4 (50%). Por tanto, la baja hidroxilación de las membranas de PEA significativamente mejora su supervivencia *in vivo*. En cambio, la baja adición de grupos ácido acrílico al PEA induce una severa reacción inflamatoria *in vivo* en forma de queratitis estromales inmunes acompañadas de una extensa y progresiva neovascularización de toda la superficie corneal.

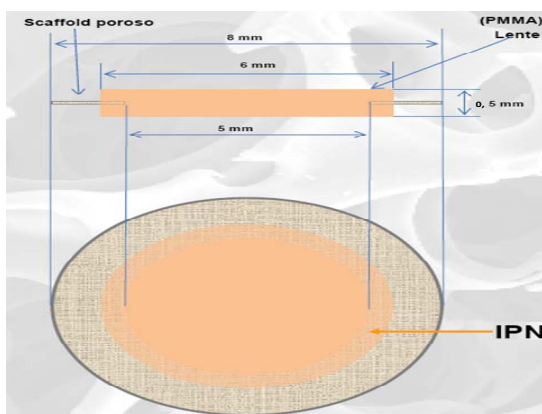
A pesar de su conocido potencial, no hemos podido encontrar diferencias significativas entre las membranas de PEA aisladas y las colonizadas por ADASC, no resultando ser capaces de mejorar la biointegración clínica o histológica ni la tasa de extrusión de las membranas. Hemos podido observar que las ADASC sobreviven *in vivo* al menos tres meses tras ser trasplantadas junto con las membranas de PEA, aunque éstas se observaron en escasa cantidad. Quizás el incremento del número de células mediante la promoción de su supervivencia o proliferación *in vivo* pueda mejorar nuestros resultados en futuros estudios, aunque nuestra impresión, a la vista de los resultados, es que estas células madre no se integran bien en un microambiente artificial generado por este tipo de scaffolds sintéticos, fallando a la hora de diferenciarse en queratocitos funcionales adultos.

Tras el procesamiento histológico de las muestras se pudo observar, en todos los casos que presentaron un implante no extruido, una cavidad en el estroma central debido a la

dehiscencia entre el biomaterial y el tejido circundante durante el corte del tejido. Esto refleja una falta de biointegración real de estos biomateriales dentro del estroma, que a pesar de su estructura macroporosa no parece que ni las ADASC ni los queratocitos del huésped invadan el biomaterial y generen nuevo colágeno y proteoglicanos dentro de él, como se podría haber esperado inicialmente. No obstante, teniendo en cuenta la normal quiescencia de los queratocitos, un seguimiento de tres meses puede no ser suficiente para completar este proceso, y quizás un seguimiento más prolongado pudiera demostrar una infiltración del implante por parte de los queratocitos del huésped, con la consiguiente mejoría de la biointegración del PEA con el estroma.

Como conclusión, en esta primera parte del estudio aportamos un nuevo tipo de biomaterial que puede ser usado como scaffold para futuros modelos queratoprótesis. Aunque es necesaria una mayor investigación al respecto antes de su aplicación clínica, hemos demostrado que la baja hidroxilación de las membranas de PEA mejora significativamente su supervivencia *in vivo*.

En la siguiente figura (Figura 48), proponemos un modelo de queratoprótesis basado en el uso de la Referencia 2 (copolímero de 90% polietilacrilato y 10% polihidroxietilacrilato) como scaffold de 8mm de diámetro, con una lente de PMMA de 6mm de diámetro y 500 micras insertada en el centro (zona óptica de 5mm), con una red interpenetrada (IPN) entre la lente y el scaffold, todo en una única pieza.



**Figura 48.-** Modelo propuesto de queratoprótesis empleando la referencia 2 como scaffold (basado en el modelo de la queratoprótesis de Boston tipo 1)

## **17. Láminas de córnea humana descelularizada**

La estructura del estroma corneal es extremadamente compleja (de hecho aún en la actualidad se siguen estudiando los patrones de distribución del colágeno dentro de la córnea), y la misma es fundamental para su normal fisiología y transparencia. A pesar de todos los esfuerzos realizados en generar bioequivalentes corneales mediante ingeniería tisular todavía no se ha conseguido reproducir la estructura de la córnea en el laboratorio, y esta meta no parece todavía cercana. Además, como hemos podido comprobar en el estudio paralelo realizado en la presente tesis doctoral con las membranas de PEA, todos los scaffolds sintéticos inducen una inflamación crónica de mecanismo inmune o mecánico, no se integran verdaderamente en el tejido, y además no parecen proporcionar un microambiente idóneo para el desarrollo celular. Por eso, en los últimos años, las matrices de córnea descelularizada han despertado un gran interés y se han desarrollado múltiples protocolos de descelularización (Lynch y cols., 2013), ya que proporcionan un entorno más natural para el crecimiento y diferenciación celular a la vez que conservan la normal y compleja ultraestructura del estroma corneal.

Hemos observado que el contenido de ADN en las láminas nativas muestra una alta variabilidad, debido probablemente al hecho de que la densidad de queratocitos en la córnea humana normal es máxima en la zona adyacente a la capa de Bowman y decrece progresivamente a lo largo del resto del estroma, estando ausentes en la recién descubierta capa Dua predescemética (Dua y cols., 2013). También se debe considerar la variabilidad interindividual en la densidad de queratocitos (Patel y cols., 2001).

En nuestro estudio hemos considerado como matriz extracelular acelular válida aquel tejido que cumplía las siguientes características: 1) Cantidad de ADN menor de 50 ng/mg de tejido; 2) Arquitectura de la matriz extracelular conservada; 3) Tejido recolonizable *in vitro*. La efectividad de descelularización de la córnea humana obtenida mediante el uso del SDS ha

sido previamente demostrada (Shafiq y cols., 2012), aunque en varias publicaciones se ha descrito que los detergentes pueden inducir daño en la membrana basal epitelial de la córnea humana, por consiguiente afectando negativamente al crecimiento epitelial pero no al fibroblástico (Choi., 2010; Crapo., 2011; Shafiq y cols., 2012). Nuestro objetivo fue la implantación intraestromal de los injertos, por lo que esta influencia negativa sobre el crecimiento epitelial careció de relevancia en nuestro estudio.

Hasta la fecha, que conozcamos, todos los intentos de repoblar scaffolds de cornea descelularizada (humana o no) han sido únicamente *in vitro* y empleando células corneales, pero como ya hemos comentado en varias ocasiones, estas células presentan grandes limitaciones para su aplicación clínica real y además no es posible utilizarlas de manera autóloga, reflejando la necesidad de utilizar células madre extraoculares que puedan sobrevivir y diferenciarse en queratocitos humanos adultos *in vivo*. Al igual que con las membranas de PEA, en nuestro estudio hemos usado las ADASC humanas para recolonizar las láminas de estroma corneal humano descelularizado debido a todas sus ventajas ya ampliamente expuestas. Nuestro estudio ha sido el primero en analizar el comportamiento *in vivo* de scaffolds de córnea descelularizada con posterior recelularización, el primero en analizar el comportamiento *in vivo* de scaffolds de cornea humana descelularizada, y el primero en repoblar estos scaffolds con células madre de origen extraocular.

En nuestro estudio *in vitro*, pudimos observar que las ADASC colonizan rápida y eficientemente las láminas de estroma descelularizado, y no solo su superficie sino también el interior de las mismas. Para ello empleamos la inyección directa de las células descrita por Shafiq (Shafiq y cols., 2012), aunque esta técnica resultó compleja y difícil a la hora de aplicarla en injertos estromales de tan solo 90 micras de espesor. Considerando además que la mayoría de las células se observaron en la superficie de la lámina tras la fijación y corte del tejido, pone de manifiesto la necesidad de mejorar nuestra técnica de recolonización para intentar



incrementar la densidad celular en el interior de la lámina y optimizar los resultados *in vivo*. No obstante, se ha demostrado que la simple siembra de queratocitos humanos sobre la superficie de la córnea acelular permite su migración, difusión y diferenciación dentro del scaffold (González-Andrades y cols., 2011), por lo que probablemente el método de inyección no sea necesario y los esfuerzos deban ser dirigidos hacia incrementar la penetración de las células mediante algún mecanismo quimiotáctico o iontoforesis. La mayor densidad celular observada en las láminas provenientes de las capas más profundas del estroma probablemente se deba a la mayor compactación del colágeno existente en el estroma anterior (Bueno y cols., 2011), pudiendo dificultar este hecho la infiltración celular de este estroma. Por esta razón sólo utilizamos láminas estromales a partir de 180 micras de profundidad para nuestro ensayo *in vivo*. La optimización de las técnicas de recolonización permitirá usar en el futuro láminas anteriores adecuadamente recelularizadas, lo cual es importante pues es el estroma anterior el mayor responsable de la resistencia de la córnea a la deformación y de su normal morfología.

A pesar de tratarse de un xenoinjerto, los resultados clínicos obtenidos fueron excelentes, con un mantenimiento completo de la transparencia corneal sin ningún signo de cicatrización a lo largo de todo el seguimiento. En la mayoría de los casos el implante era únicamente visible por una mínima elevación de la superficie corneal anterior en los bordes del injerto. No observamos ningún signo clínico de inflamación o rechazo en relación al implante, lo cual va en concordancia con el resto de estudios que han analizado el comportamiento *in vivo* de injertos estromales porcinos descelularizados sin relecularización posterior (Lynch y cols., 2013). Como ya se ha comentado, los componentes de la matriz extracelular están generalmente conservados entre especies, razón por la cual son bien tolerados estos injertos una vez eliminado su componente celular potencialmente inmunógeno.

La histología confirmó los hallazgos clínicos, mostrando en ambos grupos la completa ausencia o la presencia de un mínimo infiltrado linfocítico limitado a los extremos del injerto. Además, a pesar de usar animales inmunocompetentes y un injerto xenogénico, las ADASC humanas tampoco indujeron respuesta inflamatoria alguna en el tejido circundante, hecho ya demostrado por un trabajo previo de nuestro grupo (Arnalich y cols., 2008). Esto probablemente se deba a las demostradas propiedades inmunomoduladoras de estas células. Sin embargo, hay que señalar que estas células se mostraron incompetentes a la hora de controlar y mejorar el pronóstico de los dos casos de queratitis estromales que ocurrieron en el grupo de injertos recelularizados, mostrando el mismo resultado final que los otros tres casos ocurridos en el grupo de injertos no recelularizados, que recordemos, se produjeron por una contaminación de los mismos y no por una intolerancia primaria de la lámina.

No observamos que los queratocitos del huésped migraran hacia el injerto, el cual permaneció acelular (en el caso de los injertos no recelularizados) durante los 3 meses de seguimiento, en contraste con lo descrito en otros estudios donde sí lo observaron (Xu y cols., 2008; Lynch y cols., 2013). Esta falta de migración también se ha descrito en algunas publicaciones en las que se emplean corneas porcinas descelularizadas (Amano y cols., 2008; Hashimoto y cols., 2010). Esto quizás pueda ser explicado por la normal quiescencia y alto grado de empaquetamiento de los queratocitos dentro del estroma corneal, junto con la posible falta de señales quimiotácticas por parte del implante. No obstante, teniendo en cuenta la excelente biointegración del injerto no podemos descartar que la infiltración del mismo por parte de los queratocitos del huésped se produzca con un seguimiento más prolongado.

En varios casos hemos detectado una neovascularización leve de la córnea periférica exclusivamente a nivel de la incisión quirúrgica. Este hecho creemos que está relacionado no con el injerto en sí mismo (pues también se ha observado en los conejos controles - pocket sin injerto) sino con la proximidad de la incisión quirúrgica al limbo superior, que en los conejos se

trata de una zona intensamente vascularizada a causa de una inserción muy anterior del recto superior (a 1mm de limbo). Por tanto, esto se podría evitar o reducir realizando la incisión a nivel temporal-superior (área limbar no sobrevascularizada). El sector nasal-superior es impracticable por la presencia del tercer párpado del conejo. Los dos casos de vascularización moderada-severa encontrados fueron secundarios a un retraso en la retirada de la sutura e infección bacteriana secundaria, por lo que no consideramos valorables estos dos casos. Esta neovascularización periférica también se observó con las membranas de PEA, solo que en un grado significativamente superior, y aunque estas medidas profilácticas ayudarían también a reducirlo, en este caso sí que creemos que el injerto sintético induce un estímulo angiogénico directo.

El grupo de injertos recelularizados ha mostrado unos resultados clínicos algo mejores que el grupo de injertos sin células madre, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados. Esto es debido a la inmejorable biointegración que consiguen las láminas descelularizadas por si solas dentro del estroma corneal del conejo. Hemos demostrado, mediante la expresión del queratocán humano, que parte de la población de las ADASC trasplantadas se diferencian en queratocitos funcionales humanos, pero no todas ellas muestran esta expresión. Por tanto, esta falta de diferencias significativas entre grupos podría ser debida a una baja eficiencia en la diferenciación queratocítica. Sería interesante intentar incrementar la misma mediante el aislamiento de subgrupos de ADASC con mayor potencial de diferenciación o mediante su pre-diferenciación in-vitro antes del trasplante.

Hemos demostrado que las ADASC trasplantadas junto con injertos estromales humanos descelularizados sobreviven al menos 12 semanas tras el trasplante, permaneciendo entre las capas de colágeno del estroma donante sin alterar su patrón histológico, y además se diferencian en queratocitos adultos humanos, como ya se había demostrado previamente con

---

su inyección aislada en el estroma (Arnalich., 2008) o junto con scaffolds de ácido hialurónico (Espandar y cols., 2012). Este hallazgo es crítico pues significa que hemos tenido éxito a la hora de proporcionar el necesario componente celular adulto especializado a la matriz extracelular corneal descelularizada, y por tanto funcionalizando el tejido con una fuente extraocular de células madre.

Con este modelo de trasplante lamelar seremos capaces de obtener injertos estromales autólogos para nuestros pacientes, requiriendo únicamente una córnea donante alogénica y una muestra de su tejido adiposo, evitando teóricamente así el riesgo de rechazo estromal asociado con las opciones quirúrgicas actuales de trasplante lamelar. Lógicamente se requieren estudios adicionales para confirmar esta afirmación. Este modelo de trasplante además ofrece injertos humanos, no porcinos o bovinos, eliminando así cualquier riesgo de infecciones zoonóticas. Además, en casos de córneas previamente vascularizadas, ofrecerían un teórico menor riesgo de rechazo que los xenoinjertos descelularizados, los cuales no están totalmente exentos de este tipo complicaciones a pesar de su buena tolerancia *in vivo* (Kasimir y cols., 2006). Estos injertos se implantan dentro de un bolsillo intraestromal, por lo que el epitelio y endotelio receptores permanecen intactos, evitando así el rechazo asociado al trasplante de estas capas corneales además de acortar la recuperación postquirúrgica. Esta técnica requiere sólo uno o dos puntos de sutura que se extraen a la semana, por lo que se puede decir que es una técnica “sin suturas” capaz de evitar en consecuencia el elevado astigmatismo postoperatorio inducido por la DALK. Sería interesante analizar en futuros estudios los cambios inducidos en la potencia corneal por parte de estos injertos, pero presumiblemente un injerto amplio de 90 micras en una córnea ectática probablemente induzca un aplanamiento de la misma y por tanto un cambio hipermetrópico de la refracción.

Se trata de una técnica quirúrgica sencilla, muy similar a la actualmente utilizada para la disección manual de la DALK, y donde la experiencia quirúrgica con la técnica está

inversamente relacionada con la tasa de complicaciones intraoperatorias. Nuestra tasa de complicaciones fue (considerando los 102 ojos realizados entre los dos estudios): 3,9% de perforaciones posteriores y 10,7% de laceraciones anteriores; en su mayoría leves y con recuperación completa en menos de una semana. Por el tipo de técnica, un bolsillo intraestromal, la introducción del láser de femtosegundo simplificaría y acortaría enormemente la técnica, reduciendo drásticamente esta tasa de complicaciones, como ya ha ocurrido con los anillos intraestromales en el tratamiento de las ectasias corneales.

Las posibles aplicaciones clínicas de este modelo de trasplante lamelar son amplias, pero principalmente estaría dirigido al tratamiento de las ectasias y otros tipos de patologías debilitantes de la córnea, pudiendo sustituir a la DALK en casos de severos adelgazamientos estromales (inmunes o no) pero sin cicatrización significativa del estroma residual que limite el pronóstico visual. En ellos, la simple regeneración del estroma puede ser suficiente para evitar una eventual perforación corneal y conseguir además una rehabilitación visual rápida y sin asumir riesgos de rechazo o generar elevados astigmatismos. Por último añadir que de cada córnea donante alógena se podrían extraer al menos 4 injertos autólogos para pacientes diferentes, y además se podrían usar córneas con bajo recuento endotelial que actualmente son rechazadas para trasplante, aumentando así la disponibilidad de corneas donantes y acortando listas de espera quirúrgica. Además, la difusión de las nuevas técnicas de cirugía refractiva mediante láser de femtosegundo (SMILE: small incision lenticule extraction) (Blum y cols., 2010), va a permitir disponer de miles de lenticulos estromales de casi 100 micras de espesor que podrán ser utilizados con este fin, sin necesidad por tanto de consumir córneas donantes.

A la vista de nuestros resultados, es evidente la superioridad de estos injertos frente a las membranas de PEA, mostrando diferencias estadísticamente significativas en todos los

parámetros evaluados (trasparencia, vascularización y tasa de extrusión) y permitiendo una mejor supervivencia y diferenciación de las células madre.

Como conclusión final, aportamos un nuevo modelo de trasplante lamelar que requiere únicamente un simple y seguro procedimiento de liposucción y una córnea donante alogénica para proporcionar un injerto estromal autólogo y ópticamente transparente con demostrada excelente biocompatibilidad e integración dentro del estroma corneal de conejo, pudiendo evitar parte de las complicaciones asociadas con las técnicas actuales y por tanto mejorando el pronóstico visual y la calidad de vida de nuestros pacientes.

# *Conclusiones*

---

Las principales conclusiones de este trabajo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- 1.** La baja hidroxilación de las membranas de PEA mejora significativamente su supervivencia *in vivo*, no habiendo observado ningún caso de extrusión de estas últimas. Por tanto, es posible la aplicación de este biomaterial como scaffold de futuros modelos de queratoprótesis.
- 2.** Las ADASC sobreviven en presencia de las membranas de PEA, pero no se diferencian apropiadamente en queratocitos funcionales y no han demostrado mejorar la biointegración de las membranas con el estroma circundante ni conseguir reducir su tasa de extrusión.
- 3.** Las láminas de estroma corneal humano descelularizado con o sin posterior recelularización con ADASC humanas se integran perfectamente dentro del estroma corneal *in vivo* y no generan ninguna respuesta clínica o histológica de inflamación o rechazo a pesar de tratarse de xenoinjertos.
- 4.** Las células ADASC trasplantadas junto con las láminas descelularizadas consiguen sobrevivir y diferenciarse en queratocitos funcionales humanos.
- 5.** Es evidente la superioridad de los injertos estromales descelularizados frente a las membranas de PEA, mostrando diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados y permitiendo una mejor supervivencia y diferenciación de las células madre *in vivo*.
- 6.** Aportamos un nuevo modelo de trasplante lamelar que requiere únicamente un simple y seguro procedimiento de liposucción y una córnea donante alogénica para proporcionar un injerto estromal autólogo y ópticamente transparente con demostrada excelente biocompatibilidad e integración dentro del estroma corneal de conejo, pudiendo evitar parte de las complicaciones asociadas con las técnicas actuales y por tanto mejorando el pronóstico visual y la calidad de vida de los pacientes.



# *Bibliografía*

---

- Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, Kymionis GD. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250(3):455-7.
- Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(8):3311-7.
- Aldave AJ, Sangwan VS, Basu S, et al. International results with the Boston type I keratoprosthesis. *Ophthalmology* 2012; 119(8):1530-8.
- Almeida-Porada G, Crapnell K, Porada C, et al. In vivo haematopoietic potential of human neural stem cells. *Br J Haematol* 2005; 130(2):276-83.
- Altanerova V, Cihova M, Babic M, Rychly B, Ondicova K, Mravec B, Altaner C. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int J Cancer* 2011; 130(10):2455-63.
- Amano S, Shimomura N, Yokoo S, et al. Decellularizing corneal stroma using N<sub>2</sub> gas. *Mol Vis* 2008; 14:878-82.
- Arai F, Ohneda O, et al. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* 2002; 195(12): 1549-63.
- Arentsen JJ. Corneal transplant allograft rejection: possible predisposing factors. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1983; 81:361-402.
- Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, De Miguel MP. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 2008; 26:570-579.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009; 58(4):570-81.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46(1):219-28.
- Bhatia M, Wang JC, et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(10): 5320-5.
- Blum M, Kunert K, Schröder M, et al. Femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: preliminary 6-month results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248(7):1019-27.
- Bruin P, Meeuwse EA, Van Andel MV, et al. Autoclavable highly cross-linked polyurethane networks in ophthalmology. *Biomaterials* 1993; 14(14):1089-97.
- Brzoska M, Geiger H, et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(1):142-50.

- Bueno JM, Gualda EJ, Artal P. Analysis of corneal stroma organization with wavefront optimized nonlinear microscopy. *Cornea* 2011; 30(6):692-701.
- Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(2):370-9.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 ; 9(5): 641-50.
- Carlsson DJ, Li F, Shimmura S, Griffith M. Bioengineered corneas: how close are we?. *Curr Opin Ophthalmol* 2003; 14(4):192-7.
- Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, et al. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; 141:1277-1286.
- Chan AA, Hertszenberg AJ, Funderburgh ML, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cells with corneal keratocyte phenotype. *PLoS One* 2013;8(2):e56831.
- Chirila TV, Vijayasekaran S, Horne R, et al. Interpenetrating polymer network (IPN) as a permanent joint between the elements of a new type of artificial cornea. *J Biomed Mater Res* 1994; 28:745-753.
- Chodosh J, Dohlman C. Indications for keratoprosthesis. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea* (3<sup>th</sup> Ed). USA: Mosby Elsevier, 2011. 150:1134-1141.
- Choi JS, Williams JK, Greven M, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials* 2010; 31(26):6738-45.
- Constantin G, Marconi S, Rossi B, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 2009; 27(10):2624-35.
- Cotsarelis G, Cheng SZ, et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989; 57(2): 201-9.
- Crapo PM, et al. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32:3233-3243
- Daniel J, Abe K, McFetridge PS. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering. *ASAIO J* 2005; 51:252-61.
- Daniels JT, Dart JK, et al. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen* 2001; 9(6): 483-94.

- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; 136:729-743.
- Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol* 2005; 139:168-178.
- De Miguel MP, Alió JL, Arnalich-Montiel F, Fuentes-Julian S, de Benito-Llopis L, Amparo F, Bataille L. Cornea and ocular surface treatment. In: Current Stem Cell Research and Therapy, Special Issue: Adipose-derived stem cells, chapter 17, 2010; 5:195-204.
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012; 12(5):574-91.
- Dohlman CH, Schneider H, Doane MG. Prosthokeratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1974; 77:694-700.
- Dravida S, Gaddipati S, Griffith M, et al. A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(5):263-71.
- Dravida S, Pal R, Khanna A, Tipnis SP, Ravindran G, Khan F. The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160:239-51.
- Dua HS, Faraj LA, Said DG, et al. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013;120(9):1778-85.
- Du Y, Sundarraj N, et al. Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(11): 5038-45.
- Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005; 23:1266-75.
- Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Mol Vis* 2010; 16:2680-9.
- Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 2010; 59(12):1662-9.
- Espandar L, Bunnell B, Wang GY, et al. Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea. *Arch Ophthalmol* 2012; 130(2):202-8.
- Evans MD, Xie RZ, Fabbri M, et al. Epithelialization of a synthetic polymer in the feline cornea: a preliminary study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(7):1674-80.

- Falcinelli G, Falsini B, Taloni M, Colliardo P, Falcinelli G. Modified osteo-odonto-keratoprosthesis for treatment of corneal blindness: long-term anatomical and functional outcomes in 181 cases. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:1319-1329.
- Fang B, Song YP, Liao LM, et al. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation* 2006; 38:389-390
- Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2007; 39(10):3358-62.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356):1528-30.
- Fridenstein A. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 1982; 44(10): 3-11.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, et al. Heterotopic of bone marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6(2): 230-47.
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, et al. Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem* 2001; 276(47): 44173-8.
- Galli R, Borello U, et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3(10): 986-91.
- Garana RM, Petroll WM, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(12): 3271-82.
- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(1):79-86.
- Germain L, Auger FA, et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 1999; 67(3):140-7.
- Gibert TW, et al. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *Journal of Surgical Research* 2009; 152:135-139
- Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:212-220.
- Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009; 58(7): 929-39.

- Greiner MA, Li JY, Mannis MJ. Longer-term vision outcomes and complications with the Boston type 1 keratoprosthesis at the University of California, Davis. *Ophthalmology* 2011; 118(8):1543-50.
- Griffith M, Hakim M, Shimmura S, et al. Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea* 2002; 21(7 Suppl):S54-61.
- Griffith M, Osborne R, Munger R, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999; 286(5447):2169-72.
- Grigoriadis AE, Heersche JN, et al. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106(6): 2139-51.
- Gronthos S, Franklin DM, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189(1): 54-63.
- Gu S, Xing C, Han J, et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 2009; 15:99-107.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5):362-9.
- Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(14):3941-8.
- Hassell JR, Kimura JH, et al. Proteoglycan core protein families. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 539-67.
- Hauer H, Schmid P, et al. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(4):832-5.
- Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(5):1632-9.
- Hicks CR, Crawford GJ, Dart JKG, et al. AlphaCor clinical outcomes. *Cornea* 2006; 25:1034-1042.
- Hicks CR, Fitton JH, Chirila TV, et al. Keratoprotheses: advancing toward a true artificial cornea. *Surv Ophthalmol* 1997; 42(2):175-89.
- Hicks CR, Werner L, Vijayasekaran S, Mamalis N, Apple DJ. Histology of AlphaCor skirts: evaluation of biointegration. *Cornea* 2005; 24(8):933-40.
- Hong JW, Liu JJ, Lee J-S, et al. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2795-2803.

- Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(1):86-91.
- Howell JC, Lee WH, et al. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2003 ; 996: 158-73.
- Hsu JK, Johnston WT, Read RW, et al. Histopathology of corneal melting associated with diclofenac use after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:250-256.
- Hu X, Lui W, Cui L, et al. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Eng* 2005; 11(11-12):1710-7.
- Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, et al. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25(9):2363-70.
- Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, et al. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea* 2005; 24(8 Suppl):S32-S38.
- Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cell differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology letters* 2009; 126: 37-42.
- Jack GS, Almeida FG, et al. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* 2005; 174(5): 2041-5.
- Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alphasmooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1995a; 36:809–819.
- Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of alphasmooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 1996; 15:505–516.
- Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog. Retin. Eye Res* 1999b; 18:311–356.
- Jirásková N, Rozsival P, Burova M, Kalfertova M. AlphaCor artificial cornea: clinical outcome. *Eye (Lond)* 2011; 25(9):1138-46.
- Johnstone B, Hering TM, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238(1):265-72.
- Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003; 22:359-389.

- Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67(10):1187-94.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* 2006; 15(2):278-86.
- Katz JR, Mohamed-Ali V, et al. An in vivo study of the cortisol-cortisone shuttle in subcutaneous abdominal adipose tissue. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999 ; 50(1):63-8.
- Kompa S, Langefeld S, Kirchhof B, et al. Aachen-Keratoprosthesis as temporary implant. Case report on first clinical application. *Int J Artif Organs* 2000; 23(5):345-8.
- Kremer I, Kaplan A, Novikov I, Blumenthal M. Patterns of late corneal scarring after photorefractive keratectomy in high and severe myopia. *Ophthalmology* 1999; 106:467-473.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993 ; 260(5110): 920-6.
- Lee SD, Hsiue GH, Kao CY, Chang PC. Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. *Biomaterials* 1996; 17(6):587-95.
- Legeais JM, Renard G. A second generation of artificial cornea (Biokpro II). *Biomaterials* 1998; 19(16):1517-22.
- Liang J, Zhang H, Hua B, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 2010;69(8):1423-9.
- Liu CY, Birk DE, Hassell JR, et al. Keratocan-deficient mice display alterations in corneal structure. *J Biol Chem* 2003; 278:21672-21677.
- Liu H, Zhang J, Liu CY, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One* 2010; 5(5):e10707.
- Liu H, Zhang J, Liu CY, Hayashi Y, Kao WW. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *J Cell Mol Med* 2012;16(5):1114-24.
- Liu J, Wilson S, Mohan R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18(3):293-309.
- Lou X, Vijayasekaran S, Chirila TV, et al. Synthesis, physical characterization, and biological performance of sequential homointerpenetrating polymer network sponges based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res* 1999; 47(3):404-11.



- Lynch AP, Ahearne M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res* 2013; 108:42-7.
- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br Ophthalmol* 2004; 88(10): 1280-4
- Nijm LM, Mannis MJ, Holland EJ. The evolution of contemporary keratoplasty. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea* (3<sup>th</sup> Ed). USA: Mosby Elsevier, 2011. 112:1321-25.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351(12):1187-96.
- Nishida T, Saika S. Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea* (3<sup>th</sup> Ed). USA: Mosby Elsevier, 2011. 1:3-24.
- Nussbaum N. Cornea artificialis, ein substitute für die transplantio cornea. *Deutsche Klinik* 1853; 34:367
- Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2):315-21.
- Maguire MG, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the Collaborative Corneal Transplantation Studies. *Ophthalmology* 1994; 101:1536-1547.
- Martínez-Conesa EM, Espel E, Reina M, Casaroli-Marano RP. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(1):513-20.
- Matsuda H, Smelser GK. Electron microscopy of corneal wound healing. *Exp Eye Res* 1973; 16(6): 427-42.
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997 ; 276(5309): 66-71.
- McLaughlin BJ, Caldwell RB, Sasaki Y, Wood TO. Freeze fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res* 1985; 4:951.
- Meek KM, Quantock AJ, et al. An X-ray scattering investigation of corneal structure in keratocan-deficient mice. *Matrix Biol* 2003; 22(6): 467-75.
- Meltendorf C, Burbach GJ, Ohrloff C, Ghebremedhin E, Deller T. Intrastromal keratotomy with femtosecond laser avoids profibrotic TGF- $\beta$ 1 induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:3688-95.
- Mimura T, Amano S, Yokoo S, et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Mol Vis* 2008; 14:1819-28.

- Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 2013. pii: S1350-9462(13)00005-0.
- Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amamo S. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(10):3645-8.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3):349-55.
- Miura M, Gronthos S, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10): 5807-12.
- Muñoz P, Quiroz H, Morarega E. Anatomía quirúrgica comparada en ojos de perro, gato, cerdo y conejo. *Rev Mex Oftalmol* 1990; 64(5):177-182
- Ogawa R, Mizuno H, et al. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(4): 871-7.
- Orwin EJ, Borene ML, Hubel A. Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J Biomech Eng* 2003; 125(4):439-44.
- Osawa M, Hanada K, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996 ; 273(5272): 242-5.
- Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(2):333-9.
- Paul SR, Yang YC, et al. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood* 1991; 77(8): 1723-33.
- Pellegata NS, Dieguez-Lucena JL, Joensuu T, et al. Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. *Nat Genet* 2000; 25:91-95.
- Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2007; 75(3):424-36.
- Pittenger MF, Mackay AM, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109(5): 656-63.
- Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis* 2008; 14:431-42.

- Prockop DJ. Adult stem cells gradually come of age. *Nat Biotechnol* 2002; 20(8):791-2.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-4.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005; 129(1):118-129.
- Pujari S, Siddique SS, Dohlman CH, Chodosh J. The Boston keratoprosthesis type II: the Massachusetts Eye and Ear Infirmary experience. *Cornea* 2011; 30(12):1298-303.
- Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(5):549-77.
- Ruiz LA, Cepeda LM, Fuentes VC. Intrastromal correction of presbyopia using a femtosecond laser system. *J Refract Surg* 2009; 25:847-854.
- Russell LD, Brinster RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J Androl* 1996; 17(6):615-27.
- Saika S. TGF- $\beta$  signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea* 2004; 23:S25-S30.
- Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Loss of tumor necrosis factor  $\alpha$  potentiates transforming growth factor  $\beta$ -mediated pathogenic tissue response during wound healing. *Am J Pathol* 2006; 168:1848-1860.
- Saika S, Shiraishi A, Liu CY, et al. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem* 2000; 275:2607-2612.
- Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27:177-196.
- Sanz-Ruiz R, Santos ME, Muñoz MD, Martín IL, et al. Adipose tissue-derived stem cells: the friendly side of a classic cardiovascular foe. *J Cardiovasc Transl Res* 2008;1(1):55-63.
- Schermer A, Galvin S, et al. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103(1): 49-62.
- Schwartz RE, Reyes M, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002 ; 109(10): 1291-302.
- Seo MJ, Suh SY, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(1): 258-64.

- Shafiq MA, Gemeinhart RA, et al. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(5):340-8.
- Shao Y, Quyang L, Zhou Y, et al. Preparation and physical properties of a novel biocompatible porcine corneal acellularized matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(7):600-5.
- Shao Y, Yu Y, Pei CG, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications. *Int J Ophthalmol* 2012; 5(4):415-8.
- Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 1991; 16(5): 191-4.
- Shyu KG, Wang BW, Hung HF, et al. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2006; 13(1):47-58.
- Spangrude G J, Heimfeld S, et al. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241(4861): 58-62.
- Strampelli B. Osteo-odontokeratoprosthesis. *Ann Ottalmol Clin Ocul* 1963; 89:1039-1044.
- Tan A, Tan DT, Tan XW, Mehta JS. Osteo-odonto keratoprosthesis: systematic review of surgical outcomes and complication rates. *Ocul Surf* 2012; 10(1):15-25.
- Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(10): 1442-3.
- Thomass CC. The rabbit eye in research. Springfield: Charles C. Thomas, 1964.
- Toti P, Tosi GM, et al. CD-34 stromal expression pattern in normal and altered human corneas. *Ophthalmology* 2002; 109(6): 1167-71.
- Vanikar AV, Dave SD, Thakkar UG, Trivedi HL. Cotransplantation of adipose tissue-derived insulin-secreting mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells: a novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. *Stem Cells Int* 2010; 2010:582382.
- Von Fischern T, Langefeld S, Yuan L, et al. The "Aachen " keratoprosthesis: a new approach towards succesful keratoprosthesis-surgery. *Int J Artif Organs* 1999; 22(1): 52-7.
- Vrana NE, Builles N, Justin V, et al. Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(12):5325-31.
- Wang L, Jeong KJ, Chiang HH, et al. Hydroxyapatite for keratoprosthesis biointegration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(10):7392-9.
- Waring III GO, Bouchard CS. A matrix of pathologic responses in the cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea* (3<sup>th</sup> Ed). USA: Mosby Elsevier, 2011. 5:47-79.

- Watt FM. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(4): 410-7.
- Webb SF, Davies S, et al. A new method to obtain epithelial and stromal explants from human Corneo-Scleral Discs for the routine culture of corneal epithelial and fibroblast cells. *Methods Cell Sci* 2003; 25(3-4):167-76.
- Weissman I L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287(5457): 1442-6.
- Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis* 2005 26; 11:816-24.
- Williams KA, et al. Factors predictive of corneal graft survival. *Ophthalmology* 1992; 99:403-414.
- Woodbury D, Schwarz EJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4): 364-70.
- Xu YG, Xu YS, Huang C, et al. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis* 2008; 14:2180-9.
- Yang X, Moldovan NI, Zhao Q, et al. Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis* 2008; 14:1064-70.
- Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmol* 2012; 90(2):e125-31.
- Yoon E, Dhar S, et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007; 13(3): 619-27.
- Zerbe BL, Belin MW, Ciolino JB. Boston Type 1 Keratoprosthesis Study Group: Results from the Multicenter Boston Type 1 Keratoprosthesis Study. *Ophthalmology* 2006; 113:1779-1784.
- Zhou Y, Yuan J, Zhou B, Lee AJ, Ghawji Jr M, Yoo TJ. The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice. *Immunology* 2011; 133(1):133-40.
- Zimmermann DR, Trueb B, et al. Type VI collagen is a major component of the human cornea. *FEBS Lett* 1986; 197(1-2): 55-8.
- Zolochovska O, Yu G, Gimble JM, Figueiredo ML. Pigment epithelial-derived factor and melanoma differentiation associated gene-7 cytokine gene therapies delivered by adipose-derived stromal/mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth. *Stem Cells Dev* 2012; 21(7):1112-23.

Zuk PA, Zhu M, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279-95.

Zuk PA, Zhu M, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2):211-28.