



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DESARROLLO DEL SISTEMA DE COHESIÓN
INTERCELULAR EN EL EPITELIO CORNEAL
HUMANO GENERADO POR INGENIERÍA
TISULAR. ESTUDIO GENÉTICO E
HISTOLÓGICO.**

TESIS DOCTORAL

MARÍA INMACULADA GASCÓN GINEL

2008

**DESARROLLO DEL SISTEMA DE COHESIÓN INTERCELULAR
EN EL EPITELIO CORNEAL HUMANO GENERADO POR
INGENIERÍA TISULAR. ESTUDIO GENÉTICO E
HISTOLÓGICO.**

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía
María Inmaculada Gascón Ginel
para aspirar al título de Doctor.

Fdo.: María Inmaculada Gascón Ginel

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz
Doctor en Medicina y Cirugía.
Universidad de Granada.

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía.
Doctor en Ciencias Biológicas.
Universidad de Granada.

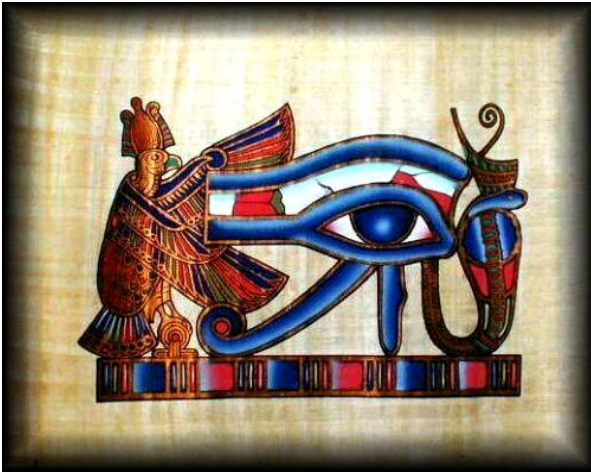
VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. Santiago Medialdea Marcos
Doctor en Medicina y Cirugía.
Universidad de Granada.

Departamento de Histología.
Universidad de Granada.
2008

Esta **Tesis Doctoral** ha sido realizada en las instalaciones del **Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada**, en el marco del **Programa Oficial de Postgrado de Ingeniería Tisular**, acreditado con la mención de calidad del Ministerio de Educación y Ciencia.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos P06-CTS-02191 (Excelencia) y CM011/2005 de la Junta de Andalucía y cuenta con la ayuda de la Fundación **FIBAO** para la Investigación Biomédica de Andalucía Oriental Alejandro Otero.



AGRADECIMIENTOS

Terminada esta Tesis Doctoral, no quisiera dejar escapar la oportunidad de expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquéllos que de una u otra manera han colaborado para que hoy sea una realidad.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis tres directores de Tesis. Al Profesor Antonio Campos, a cuyas clases de Histología tuve la suerte de acudir en la Facultad de Medicina de Granada y que desde que comencé la aventura del programa de Doctorado de Ingeniería Tisular en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada me animó para embarcarme en el apasionante viaje que ha supuesto la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Doctor Miguel Alaminos, cuyos consejos, orientaciones, ánimos y disponibilidad a cualquier hora para resolver los diferentes escollos que han ido surgiendo a medida este trabajo ha ido avanzando, han resultado fundamentales para que este proyecto haya llegado a buen puerto.

Al Doctor Santiago Medialdea, que además de ser uno de los tres directores de esta Tesis Doctoral es mi jefe en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, mi agradecimiento por sus enseñanzas sobre patología corneal, queratoplastias y el mimo con el que ha tratado los rodetes corneales procedentes de los trasplantes de córnea que ha realizado en dicho hospital y que han resultado fundamentales para realizar esta investigación.

En segundo lugar, a todo el personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada y en especial a dos personas que han resultado claves a la hora de guiar mis pasos en un mundo en el que al principio me encontraba perdida. En concreto me refiero a Ingrid J. Garzón y a Miguel González. Ingrid, a ti debo agradecerte los conocimientos que me has transmitido sobre cultivos celulares y tu ayuda en la realización de los sustitutos corneales en el laboratorio. Y a ti Miguel, gracias por tu colaboración en la realización de las técnicas de inmunofluorescencia y tus sabios consejos para que la toma de imágenes con el microscopio confocal diese los excelentes

resultados que pueden observarse en el apartado de Resultados de esta Tesis Doctoral.

Al Doctor Daniel Serrano, Jefe de Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, y a Juan de Dios López, Facultativo Especialista de Área de Oftalmología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por haberme avisado cada vez que han realizado un trasplante de córnea para que pudiese recoger los limbos esclero-corneales y gracias también por todo lo que me habéis enseñado sobre córnea en particular y sobre Oftalmología en general en esos ratos compartidos en el quirófano.

Al Doctor J. Ignacio Muñoz-Ávila, Facultativo Especialista de Área de Oftalmología del Hospital Clínico San Cecilio, por el entusiasmo que transmite en su Tesis Doctoral "UTILIDAD DE LA INGENIERÍA TISULAR EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CORNEALES" y que me animó a la realización de este proyecto de investigación.

A mis tutores durante el período de Residencia en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, Eva M^a Delgado y Juan de Dios López, y al resto de componentes del Servicio de Oftalmología por vuestra paciencia, enseñanzas, cariño y amistad durante estos años. Es un auténtico placer trabajar con vosotros.

A todos los integrantes del programa de Doctorado de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en especial al Profesor Vicente Crespo y a la Profesora M. Carmen Sánchez-Quevedo, por el trato humano y abrirnos las puertas a una disciplina desconocida para muchos de nosotros como es la Ingeniería Tisular.

Finalmente, un gran abrazo para toda mi familia y amigos por tener paciencia conmigo durante todo este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA CÓRNEA.....	2
1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.2 HISTOLOGÍA.....	6
1.2.1 EPITELIO ANTERIOR DE LA CÓRNEA.....	7
1.2.2 LÁMINA LIMITANTE ANTERIOR (MEMBRANA DE BOWMAN).....	12
1.2.3 SUSTANCIA PROPIA O ESTROMA CORNEAL.....	13
1.2.4 LÁMINA LIMITANTE POSTERIOR (MEMBRANA DE DESCOMET).....	16
1.2.5 ENDOTELIO DE LA CÁMARA ANTERIOR.....	18
1.3 RESPUESTA CORNEAL A LA AGRESIÓN.....	23
1.3.1 RESPUESTA DEL EPITELIO CORNEAL.....	23
1.3.2 RESPUESTA DE LA MEMBRANA DE BOWMAN.....	25
1.3.3 RESPUESTA DEL ESTROMA CORNEAL.....	25
1.3.4 RESPUESTA DEL ENDOTELIO CORNEAL.....	26
1.4 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA PATOLOGÍA CORNEAL SEVERA.....	27
1.4.1 TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA.....	28
1.4.1.1 HISTOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	28
1.4.1.2 PROPIEDADES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	29
1.4.1.3 TÉCNICAS DE IMPLANTE DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	29
1.4.2 QUERATOPLASTIA PENETRANTE.....	31
1.4.3 QUERATOPLASTIA LAMELAR.....	33
1.4.4 QUERATOPRÓTESIS.....	36
2. EL LIMBO ESCLEROCORNEAL.....	40
2.1 INTRODUCCIÓN.....	40
2.1.1 FUNCIONES DEL LIMBO ESCLERO-CORNEAL.....	40
2.2 ANATOMÍA.....	42
2.3 HISTOLOGÍA.....	43
2.3.1 CONJUNTIVA LÍMBICA.....	43
2.3.2 CÁPSULA DE TENON.....	46
2.3.3 LÁMINA EPIESCLERAL.....	46
2.3.4 ESTROMA LÍMBICO.....	46
2.3.5 SISTEMA DE DRENAJE DEL HUMOR ACUOSO (RED O SISTEMA TRABECULAR Y SENO VENOSO DE LA ESCLERA).....	46

2.4 INSUFICIENCIA LÍMBICA.....	48
2.4.1 DEFINICIÓN DE INSUFICIENCIA LÍMBICA.....	48
2.4.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA.....	49
2.4.2.1 IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA.....	49
2.4.2.2 TRASPLANTE DE LIMBO ESCLERO-CORNEAL.....	50
2.4.2.3 EXPANSIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MADRE.....	52
3. MECANISMOS DE COHESIÓN EPITELIAL.....	54
3.1 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR.....	54
3.2 SISTEMAS DE ADHESIÓN CELULAR.....	57
3.2.1 UNIONES OCLUYENTES: ZÓNULA OCLUYENTE (<i>ZONULA OCCLUDENS</i>).....	58
3.2.2 UNIONES ADHERENTES.....	60
3.2.2.1 ZÓNULA ADHERENTE (<i>ZONULA ADHAERENS</i>).....	60
3.2.2.2 FASCIA ADHERENTE (<i>FASCIA ADHAERENS</i>).....	61
3.2.2.3 MÁCULA ADHERENTE DESMOSOMA (<i>MACULA ADHAERENS</i>)... ..	62
3.2.2.4 ADHESIÓN FOCAL.....	64
3.2.2.5 HEMIDESMOSOMA.....	64
3.2.3 UNIONES DE COMUNICACIÓN: NEXO O UNIÓN COMUNICANTE (<i>GAP JUNCTION</i>).....	65
4. LA INGENIERÍA TISULAR.....	67
4.1 CONCEPTOS GENERALES DE INGENIERÍA TISULAR.....	67
4.1.1 INGENIERÍA TISULAR Y EQUIVALENTES TISULARES.....	67
4.1.2 TECNOLOGÍA CELULAR E INGENIERÍA DE CONSTRUCTOS.....	68
4.1.2.1 TECNOLOGÍA CELULAR.....	68
4.1.2.2 INGENIERÍA DE CONSTRUCTOS.....	71
4.2 INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA.....	73
4.2.1 INTRODUCCIÓN.....	73
4.2.2 QUERATOPRÓTESIS O PRÓTESIS CORNEALES ARTIFICIALES.....	74
4.2.2.1 QUERATOPRÓTESIS BIOCOMPATIBLES.....	74
4.2.2.2 QUERATOPRÓTESIS BIOLÓGICAS.....	77
4.2.2.3 CONCLUSIONES SOBRE LAS QUERATOPRÓTESIS.....	79
4.2.3 PRÓTESIS CORNEALES BIOLÓGICAS (EQUIVALENTES CORNEALES).....	81
4.2.3.1 INTRODUCCIÓN.....	81
4.2.3.2 ESTADO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA.....	82
4.2.3.3 BIOMATERIALES EN LA INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA.....	83
II. OBJETIVOS.....	90
1. OBJETIVOS GENERALES.....	91
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	91

III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 93

1. OBTENCIÓN DE LIMBOS ESCLEROCORNEALES HUMANOS LIBRES DE PATOLOGÍA.....	94
2. DESARROLLO DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS A PARTIR DE CÉLULAS PROCEDENTES DE LIMBOS ESCLERO-CORNEALES HUMANOS.....	97
2.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES.....	97
2.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE QUERATINOCITOS ESTROMALES.....	101
3. SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE LOS CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DE LA CÓRNEA.....	103
4. CONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	104
5. ELABORACIÓN DE UN SUSTITUTO DEL ESTROMA CORNEAL: FABRICACIÓN DE UN GEL DE FIBRINA HUMANA Y AGAROSA AL 0,1%.....	105
6. CONSTRUCCIÓN DE UN EQUIVALENTE DE CÓRNEA HUMANA COMPUESTO POR EPITELIO Y ESTROMA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....	107
7. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES.....	110
7.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	110
7.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN.....	112
7.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	112
7.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	112
8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>MICROARRAY</i>	114
9. INMUNOFLUORESCENCIA.....	116

IV. RESULTADOS..... 119

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CORNEALES HUMANAS.....	120
1.1 CULTIVO DE CÉLULAS DEL EPITELIO CORNEAL HUMANO.....	120
1.2 CULTIVO DE QUERATOCITOS ESTROMALES HUMANOS.....	123

2. GENERACIÓN DE SUSTITUTOS CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....	125
3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE EQUIVALENTES CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL.....	126
3.1 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL COMPONENTE EPITELIAL.....	126
3.2 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL COMPONENTE ESTROMAL.....	130
4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON DESMOSOMAS MEDIANTE <i>MICROARRAY</i>	131
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON DESMOSOMAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	135

V. DISCUSIÓN..... 138

1. UTILIDAD DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES FABRICADOS EN LABORATORIO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....	139
2. GENERACIÓN DE EQUIVALENTES CORNEALES HUMANOS CON EPITELIO ORTOTÍPICO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....	143
2.1 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES Y ESTROMALES DE CÓRNEA HUMANA.....	143
2.1.1 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES.....	143
2.2.2 CULTIVO DE QUERATOCITOS DEL ESTROMA CORNEAL.....	146
2.2 FABRICACIÓN DE SUSTITUTOS ESTROMALES.....	148
2.3 DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL.....	149
3. RETOS PARA EL FUTURO.....	157
3.1 CULTIVO DE ENDOTELIO CORNEAL HUMANO.....	157
3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL SUSTITUTO ESTROMAL HUMANO.....	159
3.3 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL Y COMPLETO.....	161
3.4 EVALUACIÓN DE LOS SUSTITUTOS CORNEALES <i>IN VIVO</i>	163

VI. CONCLUSIONES..... 167

VII. BIBLIOGRAFÍA..... 171

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1: Aspecto al microscopio óptico de una córnea humana normal teñida con hematoxilina-eosina.	2
FIGURA 2: Esquema de la estructura de la película lagrimal.....	4
FIGURA 3: Córnea humana observada al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina.....	6
FIGURA 4: Imagen de la córnea humana obtenida mediante tomografía de coherencia óptica de alta resolución.....	7
FIGURA 5: Epitelio corneal teñido con hematoxilina-eosina.....	8
FIGURA 6: Descamación del epitelio corneal humano observada mediante MEB.....	10
FIGURA 7: Detalle a mayor aumento.....	10
FIGURA 8: Esquema de la membrana basal del epitelio corneal humano.....	11
FIGURA 9: Imagen de la membrana basal del epitelio corneal obtenida mediante MET.....	11
FIGURA 10: Aspecto de la membrana de Bowman tras su tinción con hematoxilina-eosina.....	12
FIGURA 11: Esquema en tres dimensiones de la ultraestructura del estroma corneal.....	14
FIGURA 12: Imgen de la córnea humana observada al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina.....	15
FIGURA 13: Imagen de la córnea humana observada al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina.....	15
FIGURA 14: Fotografía del estroma corneal humano obtenida mediante MET.....	16
FIGURA 15: Sección corneal teñida con hematoxilina-eosina.....	17
FIGURA 16: Sección equivalente observada mediante MEB.....	17
FIGURA 17: Cambios en la membrana de Descemet con el tiempo.....	17
FIGURA 18: Esquema de la estructura tridimensional de la membrana de Descemet.....	18
FIGURA 19: Aspecto del endotelio corneal humano cuando es observado mediante microscopía electrónica de barrido.....	19
FIGURA 20: Misma imagen a mayor aumento.....	19
FIGURA 21: Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión del endotelio de la córnea humana.....	20
FIGURA 22: Imágenes del endotelio corneal humano obtenidas mediante microscopía confocal.....	22
FIGURA 23: Hipótesis X, Y, Z del movimiento celular Thoft y Friend.....	24
FIGURA 24: Esquema de la estructura de la membrana amniótica humana.....	28
FIGURA 25: Pieza de membrana amniótica humana teñida con hematoxilina-eosina.....	28
FIGURA 26: Esquema del implante de membrana amniótica según la técnica de injerto-sustrato.....	30
FIGURA 27: Esquema del implante de membrana amniótica según la técnica de parche-recubrimiento.	31
FIGURA 28: Queratoplastia penetrante con puntos sueltos.....	32
FIGURA 29: Queratoplastia penetrante con sutura continua.....	32
FIGURA 30: Aspecto de una queratoplastia penetrante a los 14 meses de su realización.....	32
FIGURA 31: Rechazo crónico de una queratoplastia penetrante.....	32
FIGURA 32: Disección manual del <i>flap</i> corneal durante una queratoplastia lamelar anterior.....	34
FIGURA 33: Aspecto del mismo ojo al término de la cirugía.....	34
FIGURA 34: Queratoplastia lamelar anterior superficial observada en la lámpara de hendidura.....	35
FIGURA 35: Queratoplastia lamelar anterior profunda evaluada con lámpara de hendidura.....	35
FIGURA 36: Descompensación endotelial tras cirugía de catarata e implante de lente en cámara posterior.....	35
FIGURA 37: Aspecto al término de una queratoplastia lamelar posterior.....	35
FIGURA 38: Utilidad de la tomografía de coherencia óptica en el seguimiento de las queratoplastias lamelares posteriores.....	36
FIGURA 39: Queratoprótesis temporales.....	37
FIGURA 40: Osteodontoqueratoprótesis.....	38
FIGURA 41: Queratoprótesis AlphaCor (Prótesis de Chirila).....	38

FIGURA 42: Muestra humana teñida con hematoxilina-eosina que incluye córnea, limbo esclerocorneal y esclerótica.....	42
FIGURA 43: Esquema del limbo esclero-corneal y del ángulo irido-corneal.....	43
FIGURA 44: Limbo esclerocorneal.....	44
FIGURA 45: Imagen a mayor aumento de las empalizadas límbicas de Vogt.....	44
FIGURA 46: Esquema de la estructura del epitelio del limbo esclero-corneal.....	45
FIGURA 47: Muestra de limbo humano teñida con hematoxilina-eosina y observada al microscopio óptico.....	45
FIGURA 48: Imagen de la malla trabecular humana obtenida mediante MEB.....	47
FIGURA 49: Insuficiencia límbica secundaria a quemadura por álcali.....	48
FIGURA 50: Citología de impresión de la córnea de un paciente con insuficiencia límbica.....	48
FIGURA 51: Tratamiento mediante implante de membrana amniótica de una insuficiencia límbica severa causada por quemadura por álcali.....	49
FIGURA 52: Toma de injerto para la realización de un autotrasplante de limbo.....	50
FIGURA 53: Trasplante heterólogo de limbo combinado con queratoplastia lamelar anterior.....	51
FIGURA 54: Mucosa oral cultivada en suero autólogo y en suero bovino fetal.....	52
FIGURA 55: Estudio de adhesión celular de mucosa oral cultivada (inmunofluorescencia).....	53
FIGURA 56: Tipos de uniones intercelulares según su extensión.....	57
FIGURA 57: Esquema de una <i>zonula occludens</i> donde se muestra su localización en la célula y su estructura.....	59
FIGURA 58: Imagen por microscopía electrónica de barrido tras someter una muestra de tejido epitelial al proceso de criofractura.....	59
FIGURA 59: Esquema que muestra la estructura de una zónula adherente.....	61
FIGURA 60: Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de un complejo de unión.....	61
FIGURA 61: Imagen obtenida mediante MET en la que pueden observarse dos células epiteliales unidas entre sí por una fascia adherente y por un desmosoma.....	62
FIGURA 62: Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de un desmosoma.....	62
FIGURA 63: Representación esquemática de un desmosoma.....	63
FIGURA 64: Representación esquemática de una adhesión focal.....	64
FIGURA 65: Estructura de un hemidesmosoma.....	65
FIGURA 66: Representación esquemática de una unión GAP.....	66
FIGURA 67: Imágenes mediante MEB y MET de una unión GAP.....	66
FIGURA 68: Tipos básicos de constructos utilizados en Ingeniería Tisular.....	71
FIGURA 69: Aspecto de las fibras de Dacron al microscopio electrónico de barrido.....	75
FIGURA 70: Aspecto, mediante microscopía electrónica de barrido, de las fibras de Dacron tras haber estado 30 días implantadas bajo la piel del párpado inferior en conejo.....	75
FIGURA 71: Queratoprótesis de Pintucci preparada para su implante.....	76
FIGURA 72: Queratoprótesis de Pintucci extruida.....	76
FIGURA 73: Queratoprótesis AlphaCor.....	77
FIGURA 74: Esquema de una OOKP y de la técnica de implante.....	78
FIGURA 75: OOKP preparada para su implante en el tejido celular subcutáneo.....	78
FIGURA 76: Queratoprótesis de Temprano antes de su implante en el tejido celular subcutáneo.....	78
FIGURA 77: Queratoprótesis tipo Boston.....	79
FIGURA 78: Equivalente corneal de espesor completo, construido en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada, sobre un sustituto estromal a base de colágeno tipo I y empleando células corneales de conejo.....	86
FIGURA 79: Gel de fibrina humana con queratocitos en su interior preparado para su utilización como sustituto estromal.....	87
FIGURA 80: Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su interior.....	88
FIGURA 81: Equivalente corneal de espesor completo generado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada fabricado utilizando células epiteliales, estromales y endoteliales de conejo y un gel de fibrina y agarosa al 0,1%.....	89
FIGURA 82: Sistema de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4 µm.....	108
FIGURA 83: Esquema de la fabricación de sustitutos corneales empleando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo porosos Transwell®.....	109
FIGURA 84: Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizado en esta Tesis Doctoral.....	113

FIGURA 85: Cultivo de células epiteliales corneales humanas en ausencia de células alimentadoras 3T3. Microscopía de contraste de fases. 5 días de cultivo.....	121
FIGURA 86: Cultivo de células epiteliales corneales humanas en ausencia de células alimentadoras 3T3. Microscopía de contraste de fases. 23 días de cultivo.....	121
FIGURA 87: Cultivo confluyente de células epiteliales corneales humanas a mayor aumento.....	122
FIGURA 88: Cultivo subconfluyente de queratocitos corneales humanos.....	124
FIGURA 89: Equivalente corneal humano compuesto de estroma y epitelio tras cultivo aire-líquido observado mediante microscopía óptica.....	127
FIGURA 90: Epitelio de los constructos corneales humanos analizado mediante microscopía electrónica de barrido.....	128
FIGURA 91: Fotografías tomadas mediante MET del epitelio de los sustitutos corneales de espesor parcial.....	129
FIGURA 92: Constructo corneal humano de espesor observado mediante microscopía óptica. Detalle del componente estromal.....	130
FIGURA 93: Córneas humanas control. Detección de desmoplaquina, desmogleína 3, y placoglobina 3 a nivel epitelial mediante inmunofluorescencia.....	135
FIGURA 94: Constructos corneales humanos inmaduros con epitelio compuesto por una capa celular. Detección de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina 3 a nivel epitelial mediante inmunofluorescencia.....	136
FIGURA 95: Constructos corneales humanos inmaduros con epitelio compuesto por 2-3 capas celulares. Expresión de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina 3 a nivel epitelial evaluada mediante inmunofluorescencia.....	136
FIGURA 96: Constructos corneales humanos inmaduros con epitelio compuesto por 6-7 capas celulares. Detección de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina 3 a nivel epitelial mediante inmunohistoquímica.....	137
FIGURA 97: Constructos corneales humanos maduros, tras cultivo aire-líquido. Detección de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina 3 mediante inmunofluorescencia.....	137
FIGURA 98: Desarrollo postnatal del epitelio corneal central en ratas.....	152
FIGURA 99: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por una única capa celular. Expresión de desmoplaquina.....	153
FIGURA 100: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por 2 estratos celulares. Expresión de desmoplaquina y desmogleína 3.....	154
FIGURA 101: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por 6 estratos celulares. Expresión de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina.....	155

ÍNDICE DE TABLAS:

TABLA I: Composición química de los medios de cultivo DMEM y Ham F12. Valores expresados en gramo por litro de medio de cultivo.....	100
TABLA II: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta Tesis Doctoral.....	118
TABLA III: Valores normalizados (media y desviación típica) de la expresión de genes relacionados con la síntesis de desmosomas estudiados en esta Tesis Doctoral, cuantificación realizada mediante <i>microarray</i>	133
TABLA IV: Expresión media de ARNm de genes responsables de la síntesis de placoglobina 3, desmogleína 3 y desmoplaquina en constructos corneales humanos tras 15 días de cultivo aire-líquido, en cultivos primarios de epitelio corneal humano y en cultivos primarios de queratocitos estromales humanos (Valores normalizados).....	134

INTRODUCCIÓN

1. LA CÓRNEA

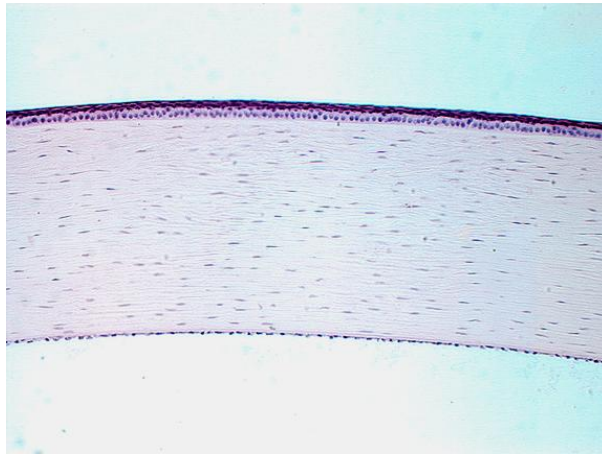


FIGURA 1: Aspecto al microscopio óptico de una córnea humana normal teñida con hematoxilina-eosina.

INTRODUCCIÓN:

La córnea (FIGURA 1) es una estructura transparente carente de vasos, a través de la cual la luz penetra en el ojo. Su nombre procede del latín *corneus*, debido al aspecto que adquiere tras la muerte.

Vista desde su cara anterior la córnea es ligeramente elíptica, de alrededor de 10,5 mm de diámetro vertical y 11,5 mm de diámetro horizontal, debido a la superposición en la zona superior e inferior del limbo, que es menos transparente. Sin embargo, observada desde atrás, la córnea es una estructura circular, con un diámetro similar al mayor diámetro externo. El espesor corneal, medida de gran importancia en la cirugía refractiva, es una medida variable de unos individuos a otros y

dependiendo de la zona de la córnea de que se trate: unos 0,52 (0,48-0,58) mm en la zona central y 0,7-0,8 mm en periferia (*Maurice DM, 1984*).

La córnea posee una rica inervación sensitiva procedente de la rama oftálmica (Va) del Nervio Trigémino que forma un plexo en el estroma corneal, siendo éste más denso justo debajo de la membrana de Bowman y emitiendo desde aquí abundantes ramificaciones que se introducen entre las células del epitelio anterior corneal. Por el contrario, son escasas las ramificaciones hacia el estroma profundo y no se han encontrado terminaciones nerviosas a nivel del endotelio corneal en el humano (*Mawas MJ, 1951*).

La nutrición la región corneal periférica adyacente al limbo proviene de la red capilar pericorneana, dependiendo el resto de la córnea para su nutrición de la difusión desde el humor acuoso de la cámara anterior. Al contrario de lo que se pensaba, la difusión desde la película lagrimal no es muy importante. Parece ser que la principal misión de esta capa lagrimal, de unas 7 micras de grosor, compuesta por una capa lipídica, una capa acuosa y una capa mucinosa (*Mishima S et al., 1961*), y que se dispone sobre el epitelio corneal, es hacer de la superficie corneal una interfase óptica lisa con el aire lo cual es imprescindible para una buena agudeza visual (FIGURA 2). Esta función es fácilmente observable en pacientes con síndrome de ojo seco, en los cuales está descrito un fenómeno denominado BIVA -*Blinking Improvement of Visual Acuity*: mejoría de la agudeza visual con el parpadeo- (*Murube J, 1997*).

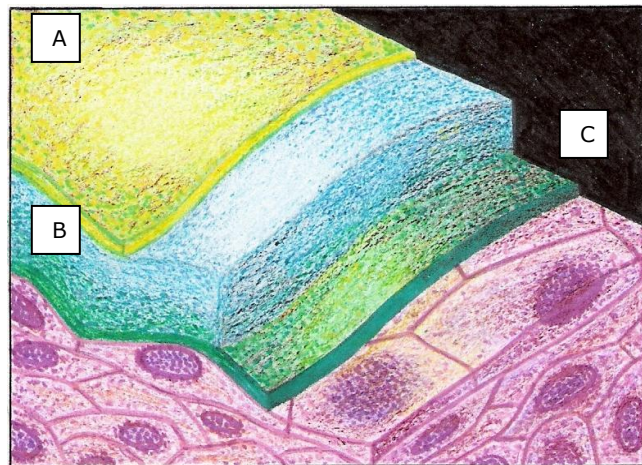


FIGURA 2: Esquema de la estructura de la película lagrimal donde podemos distinguir los tres componentes de la misma: la capa lipídica (A), la capa acuosa (B) y la capa mucinosa (C).

Entre las propiedades de la córnea humana existen dos de enorme importancia. Por un lado, la córnea constituye el principal dioptrio del ojo y por otro, supone una eficiente barrera frente a los agentes externos:

A) PRINCIPAL DIOPTRIO DEL OJO:

La especial estructura anatómica de la córnea genera un casquete esférico con dos superficies, una anterior y otra posterior, con distinto radio de curvatura (7,8 mm la anterior y 6,5 mm la posterior) lo que desde el punto de vista óptico-refractivo se traduce en dos dioptrios aproximadamente esféricos. El dioptrio anterior, al estar situado entre el aire (índice de refracción=1) y la córnea (índice de refracción=0,377) es convergente, con una potencia de 48,33 dioptrías, lo que supone el 75% de la refracción total del sistema óptico humano. Por el contrario, el dioptrio posterior, por estar situado entre la córnea (índice de refracción=0,377) y el humor acuoso (índice de refracción=0,337), es divergente, unas -6,15 dioptrías. De la suma de ambas potencias obtenemos el poder refractivo total de la córnea humana, unas 42 dioptrías por término medio (*Gordon RA y Donzis PB, 1985*) (*Katz M, 1989*).

B) BARRERA FRENTE AGENTES EXTERNOS:

La cantidad y variedad de agresiones que sufre el ojo a lo largo de la vida es ingente. Un rápido repaso nos lleva a pensar en bacterias, virus, amebas, hongos y otros parásitos, traumatismos físicos y químicos y cirugía. Siendo objetivos hay que reconocer que la patología ocular derivada de todas estas agresiones es escasa, o cuanto menos muy inferior a lo que podría presuponerse. Esto es debido a la especial estructura de la superficie ocular (córnea y conjuntiva), que constituye una auténtica barrera a la penetración de estos agentes y a la colaboración de los anejos oculares (cejas, párpados y aparato lagrimal) (*Murube J, 1997*).

1.2 HISTOLOGÍA:

La córnea se compone de 5 capas que de anterior a posterior son: epitelio anterior de la córnea, lámina limitante anterior o membrana de Bowman, sustancia propia o estroma corneal, lámina limitante posterior o membrana de Descemet y endotelio o epitelio posterior de la córnea (FIGURAS 3 y 4).

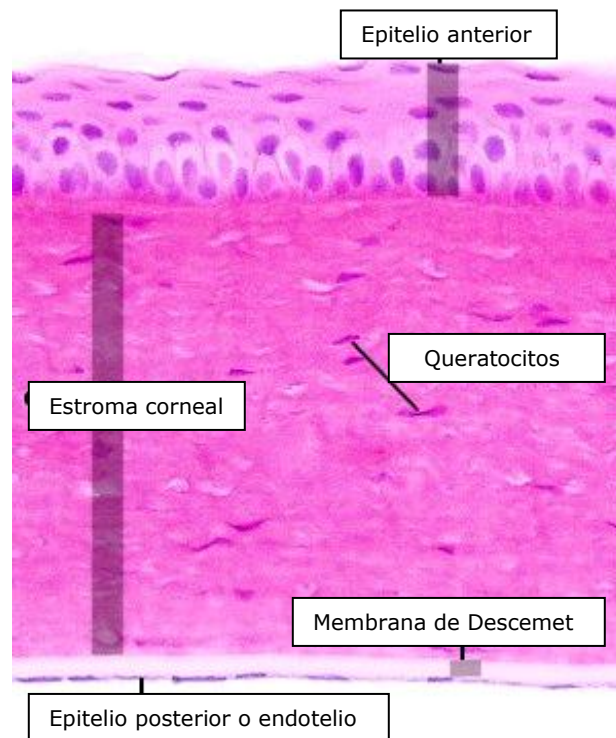


FIGURA 3: Córnea humana observada al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina. Pueden identificarse 4 de las 5 capas que la constituyen.

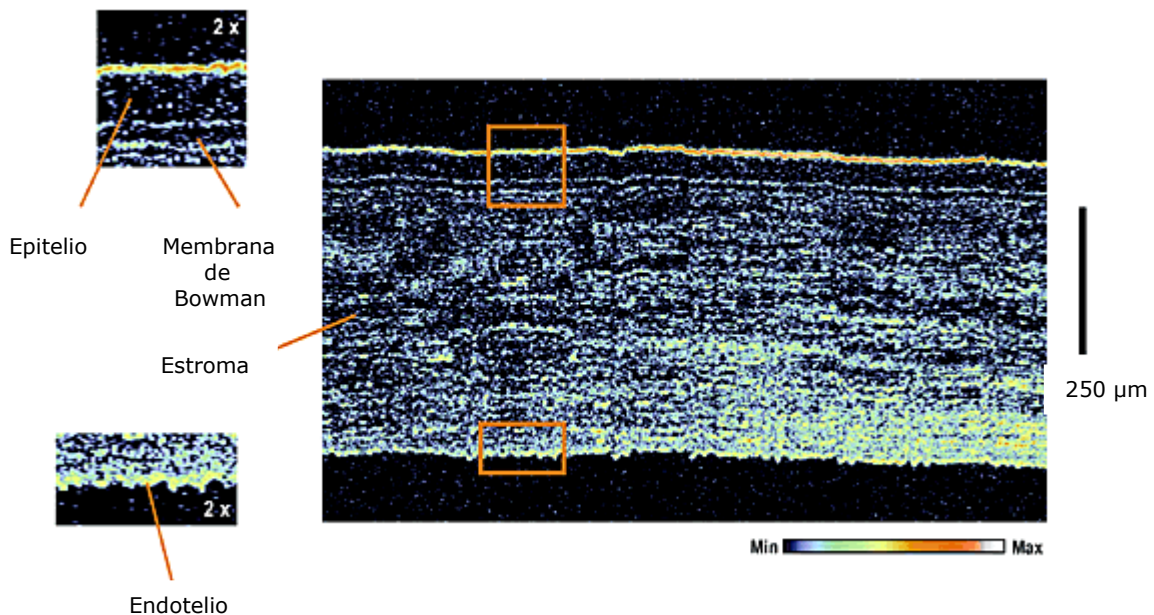


FIGURA 4: Imagen de la córnea humana obtenida mediante tomografía de coherencia óptica de alta resolución. Pueden identificarse el epitelio corneal, la membrana de Bowman, el estroma y el endotelio corneal.

1.2.1 EPITELIO ANTERIOR DE LA CÓRNEA:

El epitelio anterior de la córnea puede ser observado a nivel histológico mediante microscopía óptica (M.Ó.), microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.) y microscopía electrónica de barrido (M.E.B.), poniendo de manifiesto cada una de estas técnicas diferentes aspectos del mismo.

A) Microscopía óptica:

Se trata de un epitelio plano estratificado no queratinizado con una estructura muy uniforme, salvo en la periferia, donde se hace algo más grueso. El espesor medio del epitelio corneal es de 50 micras en su zona central y está constituido por 5-6 capas celulares en el centro corneal y 8-10 en periferia. El aspecto de estas células es diferente según el estrato del

epitelio del que se trate, pudiendo distinguirse tres tipos fundamentales de células: células apicales, células aladas y células basales (FIGURA 5).

Las *células apicales* constituyen las capas superficiales del epitelio. Son células planas, con un núcleo, aplanado que adopta una disposición paralela a la superficie epitelial y tienen un contenido en organelas relativamente escaso.

Las *células aladas* de las capas intermedias reciben este nombre por su morfología, ya que emiten unas excrecencias en forma de alas. Debido a su actividad metabólica y mitótica intermedia entre las células apicales y las basales, poseen un contenido en organelas intermedio entre ambas.

Finalmente, la capa de *células basales o columnares*, está constituida por células con una morfología más alargada y adaptadas para realizar una importante actividad reproductora en un medio relativamente anaeróbico. Este hecho condiciona que posean un menor número de mitocondrias que las células del endotelio corneal y un gran contenido en glucógeno en el retículo endoplásmico rugoso. Estas células basales proceden de las células madre limbares y con sus mitosis permiten la renovación del epitelio corneal (Thoft RA et al., 1983).

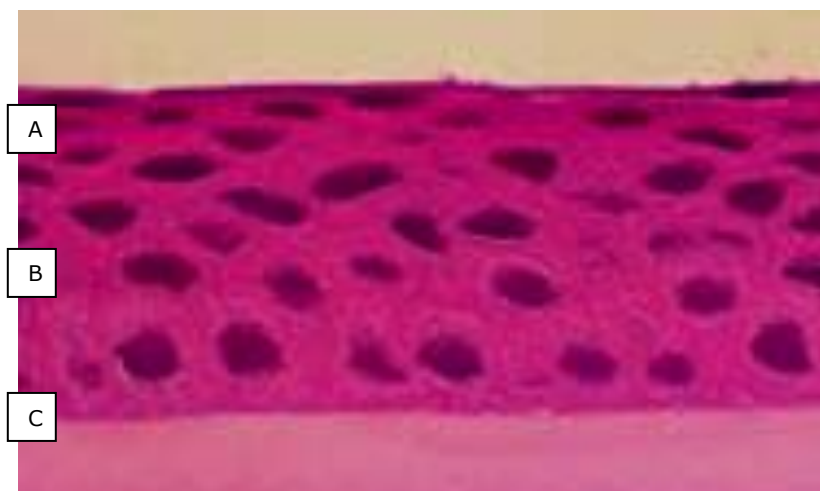


FIGURA 5: Epitelio corneal teñido con hematoxilina-eosina. Puede verse cómo cambia la estructura de las células epiteliales desde el estrato basal (células columnares: C) hasta los estratos superficiales (células apicales: A), dejando en la zona central los estratos de células alares (B).

Un dato importante de las células epiteliales corneales, que puede observarse mediante técnicas inmunocitoquímicas, es que expresan citoqueratinas específicas de la córnea, que no se encuentran en otros epitelios. Se trata de las citoqueratinas K3, codificada por el gen KRT-3, y K12, codificada por el gen KRT-12 (*Galvin S et al., 1989*) (*Kinoshita S et al., 1983*) (*Moll R et al., 1982*).

B) Microscopía electrónica de transmisión:

Mediante el microscopio electrónico de transmisión podemos apreciar cómo el epitelio corneal constituye una estrecha barrera frente al exterior gracias al establecimiento de diversos tipos de uniones intercelulares (uniones adherentes, uniones comunicantes y uniones ocluyentes). De esta manera se logra configurar una superficie que protege al resto de la córnea y del ojo de las agresiones procedentes del exterior a la vez que evita la pérdida de líquidos y electrolitos hacia el exterior.

Las zónulas ocluyentes, un tipo de uniones ocluyentes, son más abundantes en las capas más superficiales, lo cual puede explicar la escasa permeabilidad del epitelio corneal al agua y a los electrolitos de la lágrima. Las uniones comunicantes, más abundantes en las capas basales del epitelio corneal, son canales intercelulares que permiten el paso de agua, electrolitos y moléculas hidrofílicas de unas células a otras (*McLaughlin BJ et al. 1985*).

C) Microscopía electrónica de barrido:

Revela el aspecto escamoso del epitelio corneal debido a la constante descamación de las células superficiales del mismo (cada célula se recambia en unos 7 días por término medio (*Hanna C et al., 1961*)) (FIGURA 6) y muestra las abundantes microvellosidades y micropliegues que estas células emiten hacia el interior de la película lagrimal, las cuales parecen importantes para la fijación de ésta a la superficie corneal (FIGURA 7).



FIGURA 6: Imagen obtenida mediante MEB donde puede observarse el fenómeno de descamación del epitelio corneal humano.



FIGURA 7: Detalle a mayor aumento del epitelio corneal humano mediante MEB en el cual pueden identificarse las microvellosidades de las células apicales.

El epitelio corneal produce y descansa sobre una lámina basal de unos 70-75 nm de grosor. En esta lámina basal pueden diferenciarse dos capas, la *lámina lúcida* anterior y la *lámina densa* posterior. Las células basales del epitelio se anclan a la membrana basal mediante hemidesmosomas. De estos hemidesmosomas parten las fibrillas o filamentos de anclaje, de hasta 2 µm de longitud (0,6 por término medio), compuestas por colágeno tipo VII y que se fijan en las placas de anclaje situadas en la parte anterior de la membrana de Bowman o *lámina reticular*. Las placas de anclaje están formadas por colágeno tipo VII junto con colágeno IV. La lámina basal junto con la lámina reticular de la membrana de Bowman constituyen la *membrana basal* del epitelio corneal (FIGURAS 8 Y 9) (Gipson IK et al., 1987).

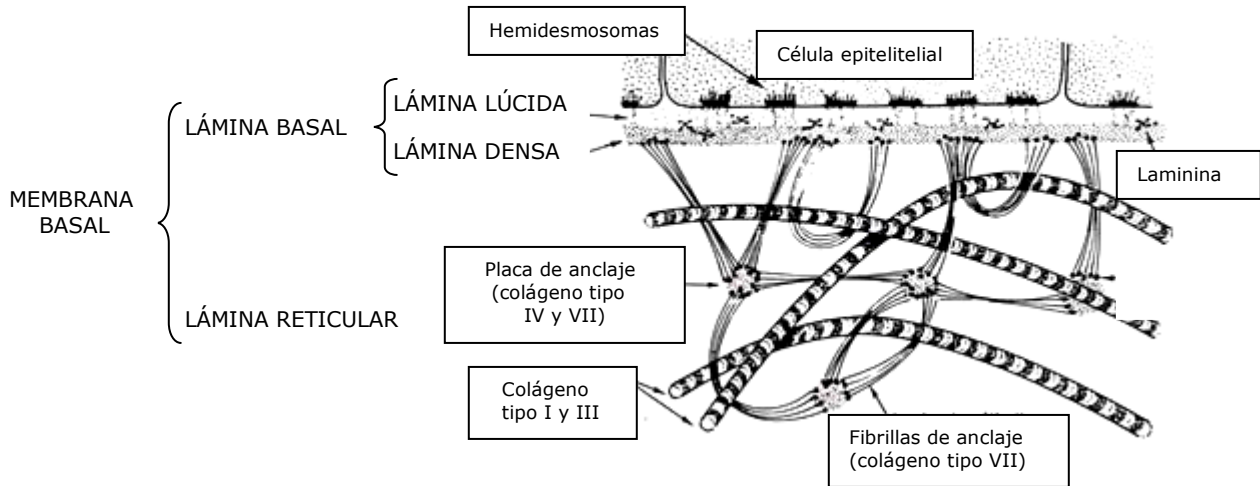


FIGURA 8: Esquema de la membrana basal del epitelio corneal humano.

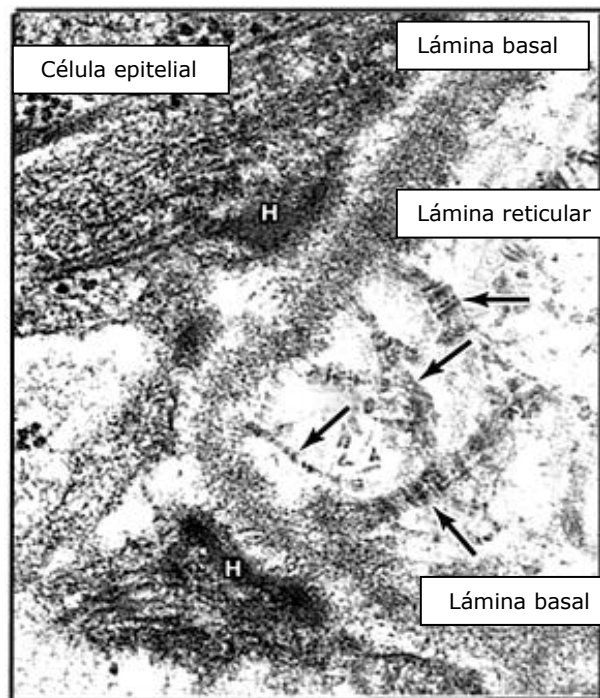


FIGURA 9: Imagen de la membrana basal del epitelio corneal obtenida mediante MET. Pueden identificarse la lámina basal, con sus dos componentes (lámina lúcida y lámina densa), y la lámina reticular. Las flecha señalan fibrillas de anclaje (colágeno VII). La letra H marca hemidesmosomas.

1.2.2 LÁMINA LIMITANTE ANTERIOR (MEMBRANA DE BOWMAN):

Se trata de una estructura acelular presente sólo en algunas especies animales, en concreto en el hombre, los primates y algunas aves (FIGURA 10). Este carácter acelular implica que la respuesta ante cualquier daño a este nivel no sea una *restitutio ad integrum* sino un fenómeno de cicatrización. En realidad no es una verdadera membrana sino la parte más anterior, modificada, del estroma corneal y se le presupone una función de refuerzo mecánico de éste. Tiene un espesor medio de 8-12 μm y es atravesada por numerosos axones sensitivos, procedentes del plexo nervioso estromal, a través de poros presentes en ella. Estos axones, una vez atravesada la membrana de Bowman, pierden la vaina de Schwann y se distribuyen como axones desnudos entre las células del epitelio corneal (Geneser F, 2000) (Mawas MJ, 1951) (Rozsa AJ et al., 1982).

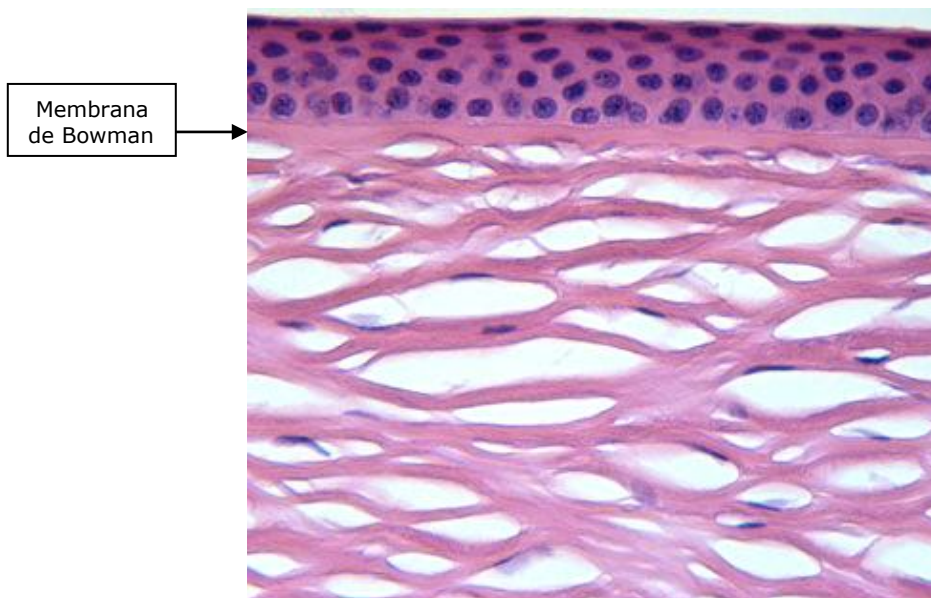


FIGURA 10: Aspecto de la membrana de Bowman tras su tinción con hematoxilina-eosina. Puede apreciarse su carácter acelular.

A) Microscopía electrónica de transmisión:

La membrana de Bowman está constituida por microfibrillas estriadas de colágeno tipo I, III, V y VI de unos 25 nm de grosor con disposición irregular (Komai Y, 1991) (Marshall GE et al., 1991) (Marshall GE et al., 1991). A nivel de las placas de anclaje, como anteriormente citamos, encontramos colágeno tipo IV y VII (Gipson IK et al., 1987).

B) Microscopía electrónica de barrido:

El límite anterior de la membrana de Bowman se encuentra bien definido bajo la membrana basal del epitelio corneal. Sin embargo el límite posterior está peor definido, introduciéndose fibras de la membrana limitante anterior en el estroma y viceversa, lo que explica la fuerte unión existente, en condiciones normales, entre estas dos estructuras contiguas (Komai Y, 1991).

1.2.3 SUSTANCIA PROPIA O ESTROMA CORNEAL:

La sustancia propia o estroma corneal, con un espesor de unos 0,45 mm en el centro corneal y unos 0,7 mm en la periferia, constituye el 90% del grosor corneal. Un rápido vistazo al estroma corneal nos permite detectar una propiedad clave de éste, su enorme regularidad (FIGURA 11). Regularidad que resulta fundamental para permitir la transparencia de la córnea. La transparencia corneal es posible gracias a que la distancia entre las lamelas es menor que la distancia crítica para producir la dispersión de las ondas lumínicas (la mitad de la longitud de onda de la luz) y gracias a un fenómeno de interferencia destructiva que anula las ondas que sí consiguen dispersarse (Freegard TJ, 1997) (Maurice DM, 1957).

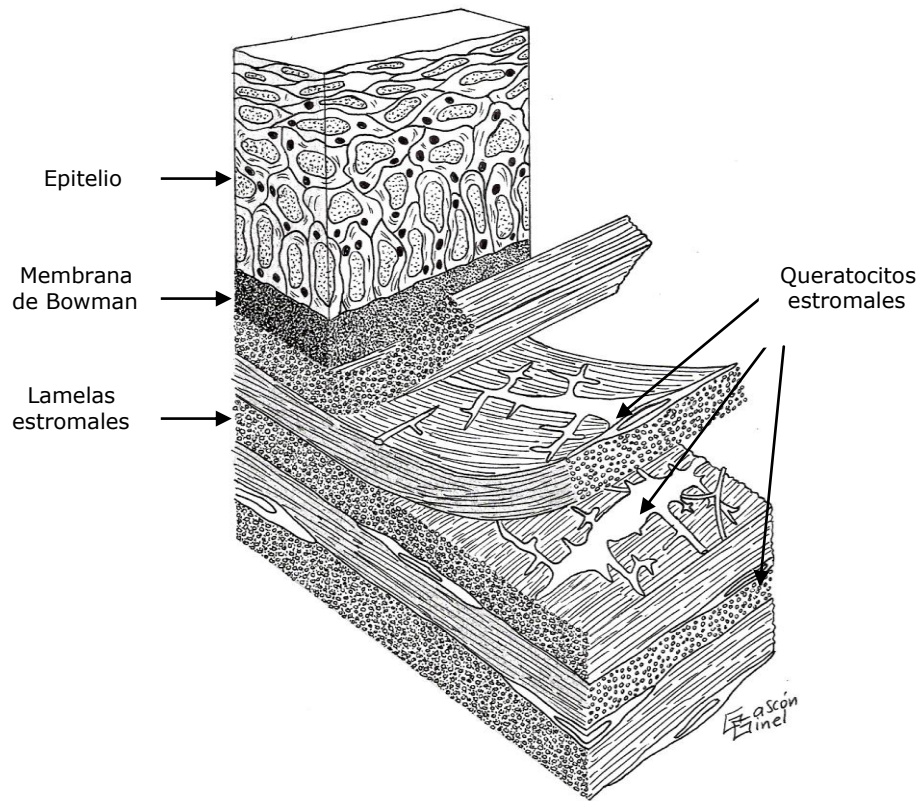
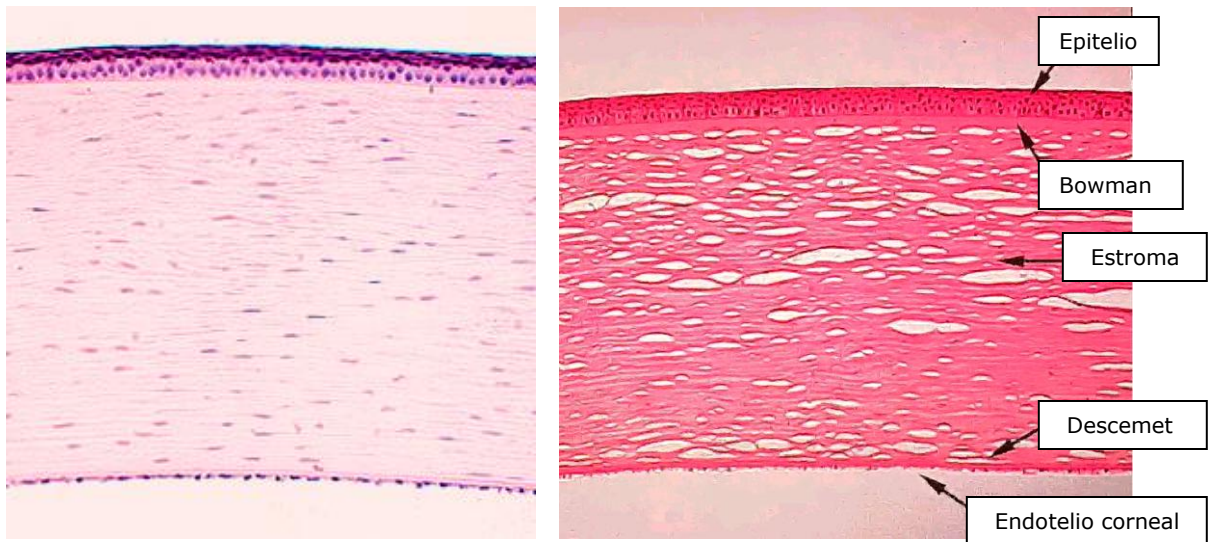


FIGURA 11: Esquema en tres dimensiones de la ultraestructura del estroma corneal.

A) Microscopía óptica:

El estroma corneal se compone de una matriz extracelular formada por colágeno y glicosaminoglicanos y un componente celular que son los queratocitos. El colágeno se organiza formando laminillas paralelas entre sí y paralelas a la superficie corneal, existiendo del orden de 200 a 250 laminillas en la córnea humana. En las hendiduras entre laminillas se sitúan los queratocitos, que no son sino fibroblastos modificados que adoptan una morfología estrellada y los responsables del mantenimiento del estroma corneal al sintetizar colágeno y glicosaminoglicanos (FIGURAS 12 y 13).



FIGURAS 12 y 13: Dos imágenes de la córnea humana observada al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina. Las dos imágenes pertenecen a córneas normales. Los espacios entre las lamelas estromales de la imagen de la derecha son un artefacto de la preparación que se produce frecuentemente.

B) Microscopía electrónica de transmisión:

Las laminillas del estroma corneal están constituidas por microfibrillas estriadas de colágeno I de 30 micras de diámetro que suponen el 98% del total del componente fibrilar del estroma corneal. El 2% restante lo constituyen fundamentalmente microfibrillas de colágeno III, V y VI (*Marshall GE et al., 1991*) (*Marshall GE et al., 1991*). La distancia constante entre microfibrillas y el paralelismo entre ellas dentro de cada laminilla se mantiene por la presencia de glicosaminoglicanos (queratansulfato, dermatansulfato y condroitinsulfato sobre todo) que forman puentes entre las microfibrillas de colágeno y participan, por su carácter hidrofílico y su carga negativa, de la hidratación corneal, absorbiendo y cediendo agua (*Fischbarg J y Maurice DM, 2004*) (*Hodson S, 1997*). No obstante existen algunas fibrillas con disposición oblicua, cruzando las lamelas, lo que aporta cohesión al estroma corneal (FIGURA 14) (*Borcherding MS et al., 1975*) (*Castoro JA et al., 1988*).

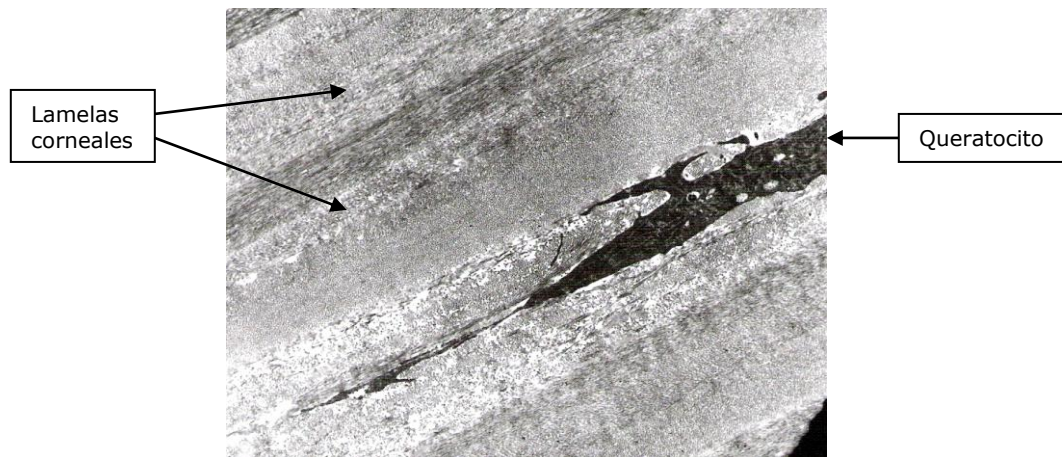


FIGURA 14: Fotografía del estroma corneal humano obtenida mediante MET. Puede apreciarse la disposición paralela de las lamelas y la presencia de un queratocito.

1.2.4 LÁMINA LIMITANTE POSTERIOR (MEMBRANA DE DESCOMET):

La membrana de Descemet constituye una capa de gran elasticidad, capacidad de regeneración y resistencia ante enzimas proteolíticos lo que explica la formación de descematoceles en casos de úlceras corneales graves. Esta estructura se interrumpe al llegar al ángulo iridocorneal conformando la línea de Schwalbe y es fácilmente disecable del estroma corneal.

A) Microscopía óptica:

La membrana de Descemet representa la membrana basal del epitelio posterior corneal y como tal es producida por éste. Tiene un espesor de unas 3 μm en el momento del nacimiento y de 10 μm en el adulto (FIGURA 15). Dentro de ella se puede distinguir una capa anterior de 2-4 micras de grosor, con bandas, que constituye la porción fetal y una capa posterior sin bandas que se desarrolla tras el nacimiento. Esta capa posterior va a constituir un auténtico registro del estado del endotelio corneal a lo largo de la vida (FIGURA 17) (Johnson DH et al., 1982).

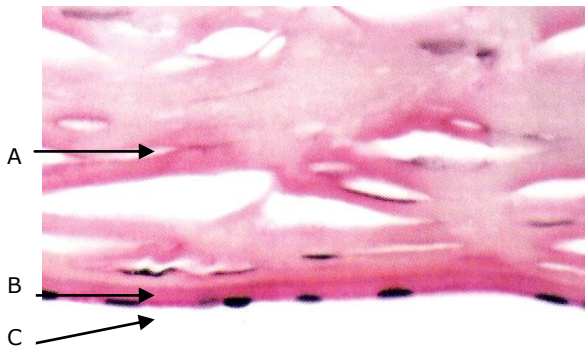


FIGURA 15: Sección corneal teñida con hematoxilina-eosina. Corte que incluye las lamelas posteriores del estroma corneal (A), la membrana de Descemet (B) y el endotelio corneal (C). Los espacios entre lamelas son artefactos de la preparación.

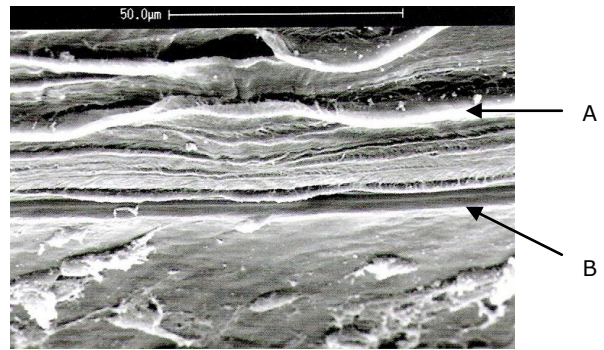


FIGURA 16: Sección equivalente observada mediante MEB. Puede observarse la cara posterior de la membrana de Descemet por haberse desprendido el endotelio durante el proceso de preparación de la muestra.

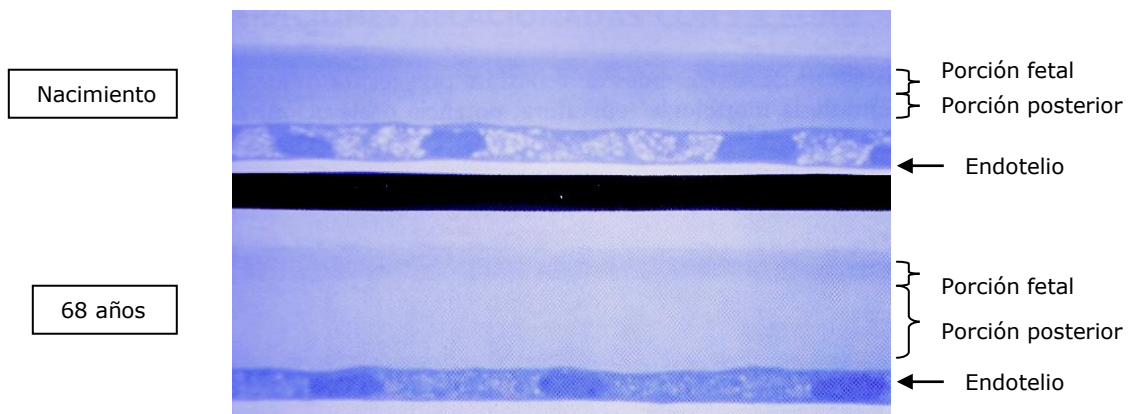


FIGURA 17: La figura ilustra los cambios en la membrana de Descemet con el tiempo. Puede observarse cómo con los años se produce un engrosamiento de la membrana de Descemet a expensas de la porción no estriada (posterior), permaneciendo sin cambios la capa fetal (anterior). También pueden apreciarse en esta imagen los cambios en el endotelio, en concreto una disminución en la densidad celular.

B) Microscopía electrónica de transmisión:

Al igual que en otras membranas basales su principal componente es el colágeno tipo IV. Su otro componente fundamental es el colágeno tipo VIII, típico de la membrana de Descemet y de algunos endotelios (*Tamura Y et al., 1991*). Ambos tipos de colágeno forman capas dentro de las cuales las microfibrillas adoptan un patrón hexagonal (*FIGURA 18*) (*Marshall GE et al., 1991*). La conformación espacial de las microfibrillas y la presencia de

colágeno V, IX y XII son las responsables de la elasticidad de la membrana de Descemet.

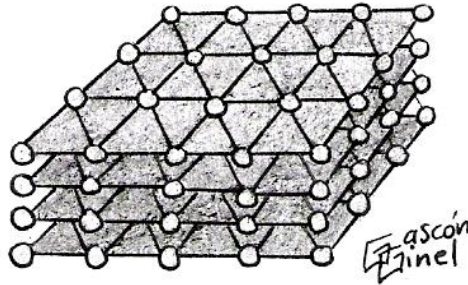


FIGURA 18: Esquema de la estructura tridimensional de la membrana de Descemet mostrando el patrón hexagonal de las fibrillas de colágeno.

1.2.5 ENDOTELIO O EPITELIO POSTERIOR DE LA CÓRNEA:

Aunque tradicionalmente ha recibido el nombre de endotelio por ser la capa más interna de la córnea y que delimitaba la superficie ventral de la cámara anterior del ojo, en sentido estricto es un epitelio puesto que deriva de la cresta neural.

A) Microscopía óptica:

Mediante microscopía óptica, el endotelio corneal se observa como un epitelio plano simple de unas 5 micras de espesor localizado en la cara posterior de la córnea.

B) Microscopía electrónica:

Las células del endotelio corneal poseen una morfología hexagonal, formando un mosaico (FIGURAS 19 y 20) que se continúa con el endotelio del trabéculum en la periferia. En el adulto joven existen unas 3000-3500 células/mm² que se relacionan entre sí mediante uniones tipo mácula ocluyente (más débiles que las zónulas ocluyentes) (FIGURA 21) (McLaughlin

BJ et al., 1985), poseen abundantes mitocondrias y transportan agua hacia el exterior de la córnea (es decir, desde el estroma hacia la cámara anterior) mediante transporte activo dependiente de ATP. Aunque aún hay aspectos desconocidos en este mecanismo de transporte, se ha comprobado que los principales aniones implicados en el mismo son el bicarbonato y el cloruro (*Bonanno JA, 2003*) y que algunos cationes como el calcio pueden también jugar un papel relevante (*Mergler S y Pleyer U, 2007*). De este modo se consigue mantener una hidratación corneal del 80%, lo cual resulta imprescindible asegurar la transparencia de la córnea (*Bonanno JA, 2003*) (*Davies N et al, 2004*) (*Hodson S y Miller F, 1976*).

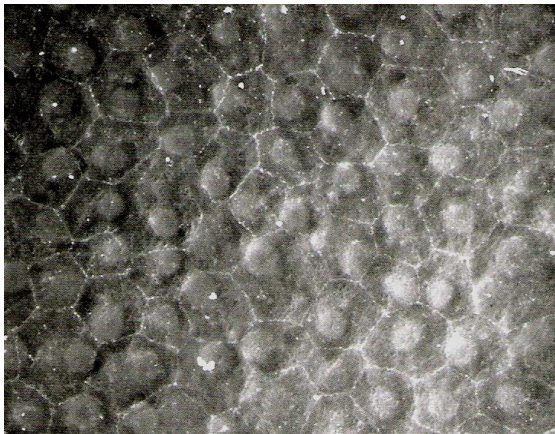


FIGURA 19: Aspecto del endotelio corneal humano cuando es observado mediante microscopía electrónica de barrido. Puede observarse el mosaico perfecto, compuesto por células de 5-7 lados.

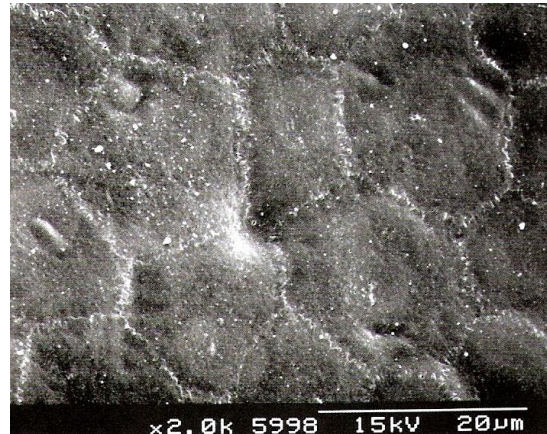


FIGURA 20: Misma imagen a mayor aumento.

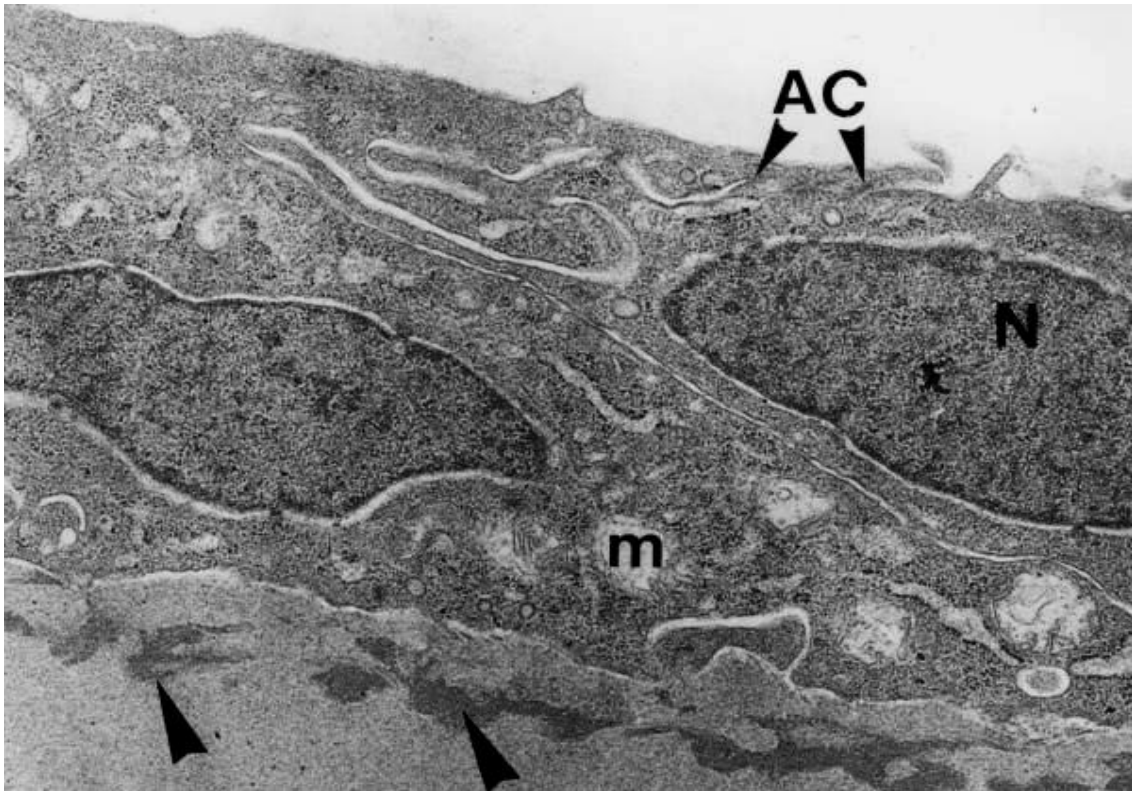


FIGURA 21: Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión del endotelio de la córnea humana. Pueden verse dos células, identificándose los núcleos de éstas (N), mitocondrias (m) y un complejo de adhesión celular tipo mácula ocludens (AC). Las flechas inferiores señalan depósitos electrodenso a nivel de la membrana de Descemet.

Aparentemente, las células endoteliales carecen de actividad mitótica y su número va disminuyendo progresivamente tras el nacimiento, siendo la pérdida fisiológica de un 0,7% anual. La pérdida celular se contrarresta mediante un proceso denominado *compensación endotelial*, consistente en un aumento del tamaño (polimegatismo) y diversidad de forma (pleomorfismo) de las células restantes para mantener recubierta toda la superficie de la membrana de Descemet (FIGURA 22) (Joyce NC et al., 1989) (Matsuda M et al., 1985). Este es un dato de gran importancia en pacientes sometidos a cirugía del segmento anterior, ya que una densidad celular menor de 400-700 células/mm² se asocia con descompensación endotelial y por tanto pérdida de la transparencia corneal por edema crónico de ésta (*queratopatía bullosa*) (Joyce NC, 2003).

Frente a la creencia de la incapacidad de las células endoteliales para dividirse existen trabajos que apuntan la posibilidad de que el endotelio corneal tenga capacidad regenerativa. Se ha comprobado, *in vitro*, que los defectos en el endotelio corneal del conejo pueden repararse mediante mitosis de las células vecinas y que esta regeneración puede ser controlada por factores exógenos (por ejemplo, puede ser inhibida mediante citostáticos como el 5-fluoruracilo o estimulada con diversos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina) (Joyce NC et al., 1989). Otros autores han conseguido realizar queratoplastias lamelares posteriores en primates utilizando células endoteliales cultivadas en laboratorio (Koizumi N et al., 2007). Por otro lado, existen estudios con córneas humanas que ponen de manifiesto que el endotelio humano *in vivo* posee capacidad mitótica, siendo ésta más intensa en individuos jóvenes. Sin embargo, las condiciones en las que las células endoteliales se encuentran *in vivo* hacen que se alargue la fase G1 y que las células precisen una fuerte estimulación para poder completar la mitosis. Se ha comprobado que los factores de crecimiento transformante α y β , presentes en el humor acuoso, impiden la entrada de las células endoteliales en fase S, y que la existencia de una monocapa confluyente de células endoteliales impide la división de éstas mediante la expresión de la proteína p27kip1, un potente inhibidor de G1 (Joyce NC, 2003). Finalmente, y en el mismo sentido, un estudio reciente en córneas de banco de tejidos encontró, en todas las edades, una densidad celular mayor en la periferia que en el centro del endotelio, lo cual sugiere la existencia de una zona limbar regenerativa para el endotelio corneal (Amann J et al., 2003) (Holley GP et al., 2002).

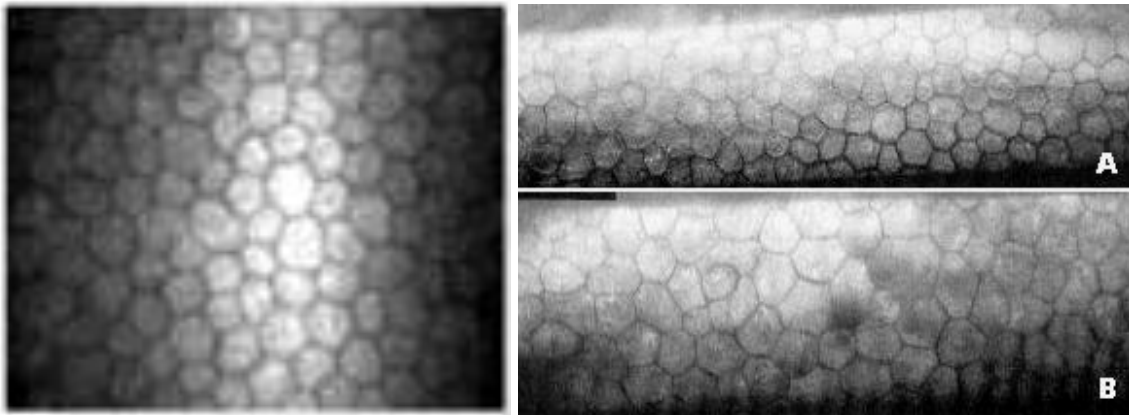


FIGURA 22: Imágenes del endotelio corneal humano obtenidas mediante microscopía confocal. La imagen de la izquierda y la imagen A proceden de un endotelio sano. La imagen B pertenece a un paciente con una pérdida leve de células endoteliales, puede apreciarse el polimorfismo y el polimegatismo de las células endoteliales.

1.3 RESPUESTA CORNEAL A LA AGRESIÓN:

La complejidad de la estructura corneal se refleja en los mecanismos de renovación fisiológica y de respuesta ante agresiones de distinto tipo que sufre la córnea.

1.3.1 RESPUESTA DEL EPITELIO CORNEAL:

Sabemos que, de forma fisiológica, el epitelio corneal se renueva cada 7 días (*Hanna C et al., 1961*) gracias a la presencia de células madre que encontramos entre las células basales del epitelio límbico, en concreto en la base de las empalizadas límbicas de Vogt (*Davanger y Evensen, 1971*) (*Tseng SCG, 1989*).

Cuando se produce un defecto o una lesión en el epitelio corneal se produce una respuesta que consta de tres fases:

1ª fase: Fase latente: Tiene una duración de 4-6 horas durante las cuales se eliminan los restos de las células dañadas, las células se redondean y disminuyen las uniones intercelulares y las uniones con la membrana basal.

2ª fase: Fase de migración celular: Durante las siguientes 24-36 horas se produce un desplazamiento de las células epiteliales perilesionales para cubrir el defecto epitelial, con lo que se recupera la función de barrera del epitelio corneal.

3ª fase: Fase de proliferación celular: Se activan las células madre del limbo esclerocorneal, se reestablecen los hemidesmosomas que fijan el epitelio a la membrana basal subyacente y las terminaciones nerviosas se distribuyen entre las células epiteliales (*Crosson, CE et al., 1989*).

Se han propuesto varias teorías para explicar tanto la renovación fisiológica del epitelio corneal como la reparación de defectos epiteliales, siendo la más aceptada la *teoría del movimiento celular de Thoft y Friend*. Esta teoría postula la hipótesis X, Y, Z según la cual la masa epitelial corneal se renueva y mantiene gracias a la descamación de las células superficiales (células Z) que son sustituidas por las células basales (células X) y por las células que proceden de la periferia y que migran hacia el centro corneal (células Y) siguiendo un movimiento centrípeto (FIGURA 23) (Thoft RA y Friend J, 1983). La teoría de Thoft y Friend es avalada por diversos estudios, como los que prueban una mayor tasa mitótica en el epitelio periférico que en el central (Ebato B et al., 1987) o la migración de células basales marcadas con átomos de carbón radiactivo desde la periferia hacia el centro de la córnea (Buck RC, 1982).

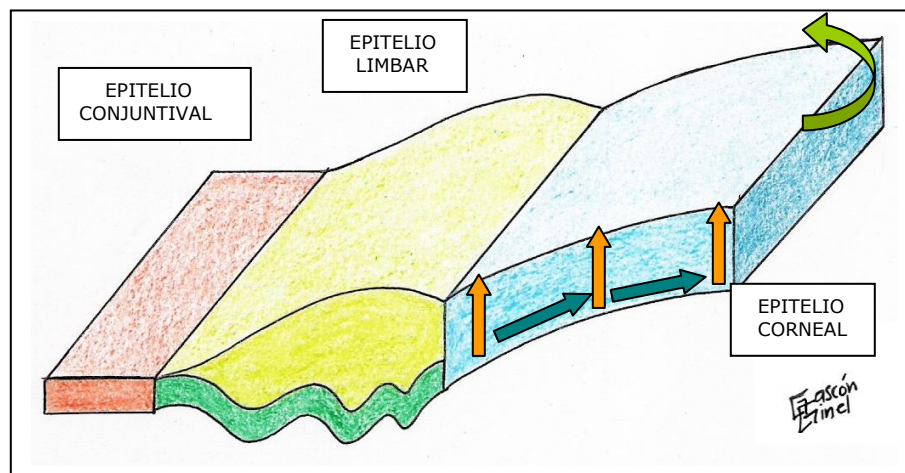


FIGURA 23: Hipótesis X, Y, Z del movimiento celular Thoft y Friend. Las células epiteliales corneales descamadas (Z: flecha verde), son reemplazadas por células epiteliales basales (X: flechas naranjas) y células que migran desde la periferia corneal (Y: flechas azules).

Para que este fenómeno tenga lugar como hemos descrito, es decir, para que el defecto epitelial corneal sea recubierto mediante un epitelio de fenotipo corneal es precisa la coexistencia de un limbo funcional y de una membrana basal íntegra.

La insuficiencia o fracaso de las células madre límbicas puede ser un trastorno congénito (por ejemplo, en la aniridia) o adquirido (causticaciones, penfigoide ocular, síndrome de Stevens-Johnson, cirugía ocular, etc.) (*Majo F et al., 2006*) (*Rodríguez A y Touriño R, 2004*). En casos de insuficiencia límbica o alteración de la membrana basal corneal, las células del epitelio conjuntival pueden recubrir de forma patológica la córnea desepitelizada, pero no son capaces de transdiferenciarse, es decir, no son capaces de expresar marcadores específicos del epitelio corneal como son las citoqueratinas K3 y K12. Este proceso por el cual la superficie corneal se recubre por un epitelio de características conjuntivales (epitelio cilíndrico, estratificado no queratinizado con *células caliciformes, también llamadas mucíparas o goblet*, productoras de mucina (*Gipson IK, 1977*)) se asocia indefectiblemente a la vascularización del estroma corneal superficial y constituye lo que se llama conjuntivalización corneal.

1.3.2 RESPUESTA DE LA MEMBRANA DE BOWMAN:

La membrana de Bowman carece de capacidad regenerativa, de manera que cuando se lesiona se forma una capa de menor grosor y resistencia, en la que puede observarse una mayor o menor pérdida de transparencia originando lo que llamamos un leucoma corneal.

1.3.3 RESPUESTA DEL ESTROMA CORNEAL:

Cuando se produce una lesión en el estroma corneal se liberan citocinas que atraen a los queratocitos hacia los márgenes de la lesión, iniciándose la formación de colágeno y mucopolisacáridos (*Davison PF y Galbavy EJ, 1986*). Hay dos hechos de enorme importancia en este proceso de cicatrización corneal:

1º) La formación de colágeno no comienza hasta que el área afecta se ha recubierto por epitelio.

2º) Las nuevas fibras de colágeno tienen una disposición irregular por lo que el tejido formado tiene una resistencia menor que la del tejido al que sustituye y no es rara la aparición de astigmatismo.

Posteriormente, la herida sufre una remodelación gradual para favorecer el reestablecimiento de la resistencia a la tensión, la cual aumenta gradualmente hasta el cuarto año tras la agresión corneal (*Gasset AR y Dohlman CH, 1968*).

1.3.4 RESPUESTA DEL ENDOTELIO CORNEAL:

Clásicamente se ha defendido la ausencia de capacidad mitótica por parte de las células del endotelio corneal. De este modo, ante la pérdida de células endoteliales por cualquier causa, las restantes deben adaptarse para cubrir el defecto generado, lo cual se consigue con el aumento de tamaño (polimegatismo) y cambios en la forma que genera diversidad de forma (polimorfismo) de las mismas (*Matsuda M et al., 1985*). Sin embargo, los trabajos de Amann J y Holley GP, publicados en 2002 y 2003 apuntan la existencia de una zona limbar regenerativa para el endotelio corneal. En el mismo sentido, diversos autores afirman que el endotelio corneal humano podría presentar cierta capacidad de regeneración *in vivo*, aunque dicha capacidad es limitada, especialmente en individuos adultos (*Joyce NC, 2003*). En cambio, la capacidad de regeneración del endotelio corneal de otros mamíferos es muy elevada, sobre todo en el caso del conejo (*Alaminos M et al., 2007*) (*Koizumi N et al., 2007*).

1.4 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA PATOLOGÍA CORNEAL SEVERA:

La patología corneal constituye un auténtico reto para el oftalmólogo, tanto desde el punto de vista diagnóstico como terapéutico. El diagnóstico diferencial entre las diferentes distrofias, degeneraciones, queratitis infecciosas, queratitis neurotróficas, ectasias corneales y descompensaciones endoteliales es con frecuencia difícil y su tratamiento en muchas ocasiones no lo es menos. Este tratamiento se basa en un gran porcentaje de casos en medidas conservadoras como son los antibióticos, antivirales, antifúngicos, antiinflamatorios e inmunosupresores tópicos, los agentes antiinfecciosos y antiinflamatorios sistémicos, las soluciones hipertónicas de cloruro sódico, los concentrados de plaquetas, el suero autólogo, la corrección óptica (incluyendo las lentes de contacto rígidas, tan de utilidad en el tratamiento de las ectasias corneales), las lentes de contacto terapéuticas, la tarsorrafia ya sea temporal o permanente e incluso el láser Excimer para ablacionar el tejido corneal superficial que ha perdido su transparencia (queratectomía fototerapéutica). Sin embargo estas medidas no siempre son suficientes para lograr la curación de estas patologías y en otras ocasiones la curación de las mismas conlleva la formación de una opacidad corneal que limita la agudeza visual, haciéndose necesario en estos casos recurrir a tratamientos más agresivos como son los implantes de membrana amniótica, los diferentes tipos de queratoplastias e incluso las queratoprótesis.

1.4.1 IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA:

La membrana amniótica que utilizamos en la práctica diaria en los servicios de Oftalmología de los Hospitales Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada es una membrana procedente de cesáreas electivas, obtenida en condiciones de esterilidad y criopreservada en una solución de dimetilsulfóxido según el protocolo del Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería (Procedimiento BST-P-03/03).

1.4.1.1 HISTOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:

La membrana amniótica está formada por un epitelio cuboideo simple que descansa sobre una membrana basal, a la que se ancla mediante hemidesmosomas (Pollard SM et al., 1976), y un estroma avascular que se divide en tres capas, que son: la *capa esponjosa*, la *capa fibroblástica* (en la que hallamos fibroblastos y células de Hofbauer) y la *capa compacta* (FIGURAS 24 y 25) (Campo Z y Gris O, 2002).

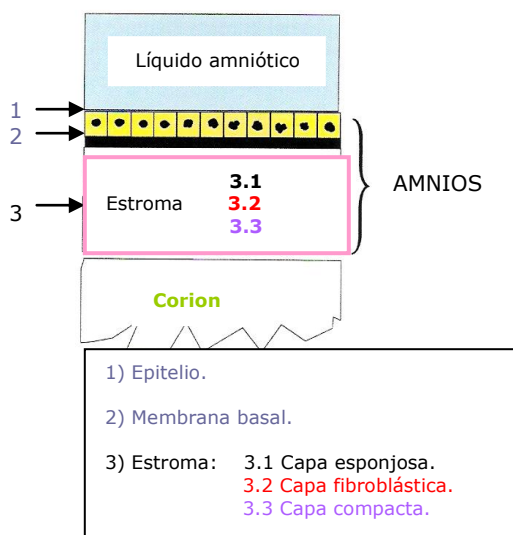


FIGURA 24: Esquema de la estructura de la membrana amniótica humana.

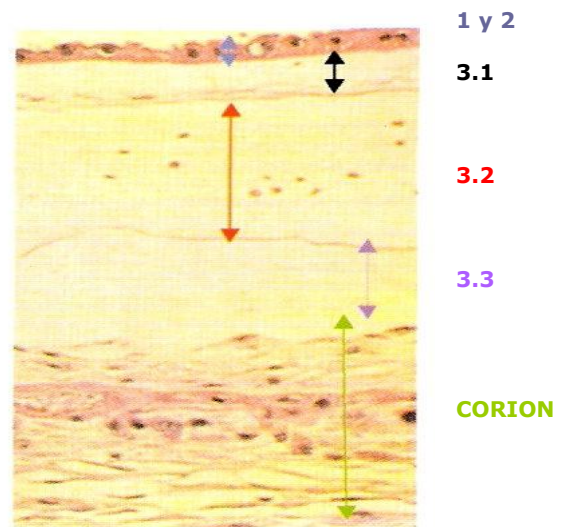


FIGURA 25: Pieza de membrana amniótica humana teñida con hematoxilina-eosina.

1.4.1.2 PROPIEDADES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:

La membrana amniótica es ampliamente utilizada en diversas especialidades médicas (como sustituto cutáneo en Dermatología, en reconstrucciones vaginales, en la reparación de onfalocelos y para prevenir la formación de adherencias en cirugía abdominal y pélvica, como agente inmunoaislante en el trasplante de islotes de Langerhans, en cirugía ortopédica, como reemplazo de la mucosa nasal en el síndrome de Rendu-Osler-Weber para disminuir los eventos hemorrágicos... (*Trelford JD y Trelford-Sauder M, 1994*)), incluida la Oftalmología, gracias a sus propiedades.

Las propiedades de la membrana amniótica incluyen, entre otras, el transporte hidroelectrolítico (*Campo Z y Gris O, 2002*), el efecto antibacteriano (*Azuara-Blanco A et al., 1999*) (*Campo Z y Gris O, 2002*), un escaso poder antigénico ya que las células del amnios no expresan los antígenos de histocompatibilidad A, B, C ni DR (*Adinolfi M et al., 1982*) (*Akle CA et al., 1981*), favorecer la correcta reepitelización de los tejidos (*Kurpakus MA et al., 1992*) al disminuir la apoptosis de las células epiteliales (*Zhou S et al., 2003*) y favorecer la migración y expansión de las células madre epiteliales (*Kim JC y Tseng SCG, 1995*), efecto antiinflamatorio (*Rigal-Sastourne JC et al., 2002*) (*Rowe TF et al., 1997*) (*Shimmura S et al., 2001*), disminución de la fibrosis (*Tseng SCG et al., 1999*) y evitar la vascularización de la superficie corneal (*Rigal-Sastourne JC et al., 2002*) (*Rowe TF et al., 1997*).

1.4.1.3 TÉCNICAS DE IMPLANTE DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:

Básicamente, podemos hablar de 2 formas de implantar la membrana amniótica, cada una de las cuales posee indicaciones diferentes.

Se trata de la utilización de la membrana amniótica como injerto-sustrato y de su utilización como parche-recubrimiento (*Prabhasawat P et al., 2001*) (*Campo Z y Gris O, 2002*) (*Azuara-Blanco A et al., 1999*):

A) INJERTO-SUSTRATO:

Según esta técnica, la membrana amniótica implantada actúa como una membrana basal sobre la que crece el tejido epitelial corneal, a la vez que aporta factores de crecimiento, restableciéndose así la superficie ocular (FIGURA 26). En casos de adelgazamiento corneal marcado es posible realizar un injerto multilaminado de membrana amniótica e incluso asociar la utilización de un adhesivo tisular, como el cianoacrilato, si existe una microperforación corneal.

Las indicaciones de esta técnica incluyen erosiones corneales recidivantes por patología de la membrana basal corneal, úlceras corneales con adelgazamiento estromal, descematoceles y microperforaciones corneales (*Campo Z y Gris O, 2002*) (*Prabhasawat P et al., 2001*) (*Chen HJ et al., 2000*) (*Kruse FE et al., 1999*).

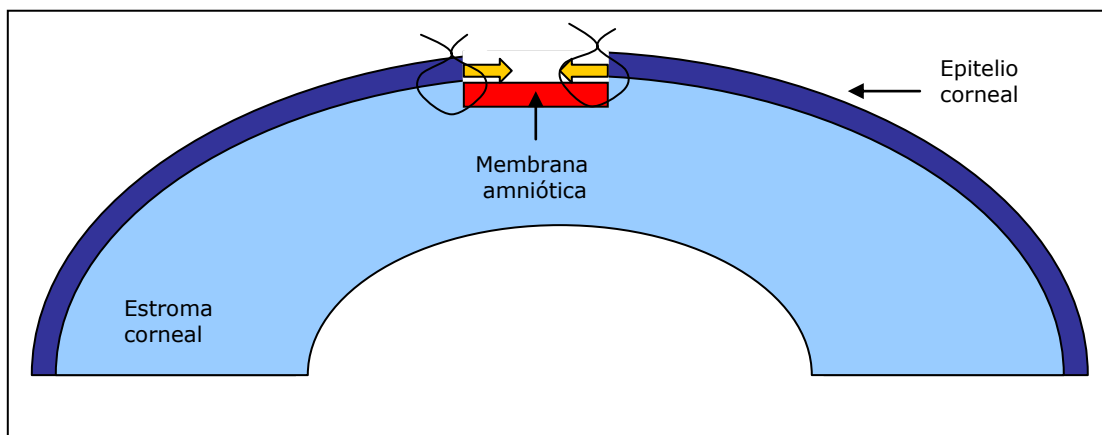


FIGURA 26: Esquema del implante de membrana amniótica según la técnica de injerto-sustrato.

B) PARCHÉ-RECUBRIMIENTO:

Consiste en la colocación de una capa de membrana amniótica bajo la cual se reducen los fenómenos inflamatorios, favoreciendo así la epitelización y disminuyendo el proceso de cicatrización (FIGURA 27).

Ésta es una técnica con múltiples aplicaciones, entre las que podemos incluir defectos epiteliales persistentes de diversa etiología (*Campo Z y Gris O, 2002*) (*Prabhasawat P et al., 2001*) (*Chen HJ et al., 2000*) (*Azuara-Blanco A et al., 1999*), tras la remoción de los depósitos de calcio con ácido etilentetraaminodiacético al 4% en la queratopatía en banda (*Campo Z y Gris O, 2002*) (*Anderson DF et al., 2001*), tratamiento sintomático de la queratopatía bullosa (*Campo Z y Gris O, 2002*) (*Pires RTF et al., 1999*) y asociado a la queratectomía lamelar terapéutica y a queratectomía fotorrefractiva para disminuir la fibrosis en el estroma subyacente (*Woo HM, 2001*) (*Choi YS, 1998*).

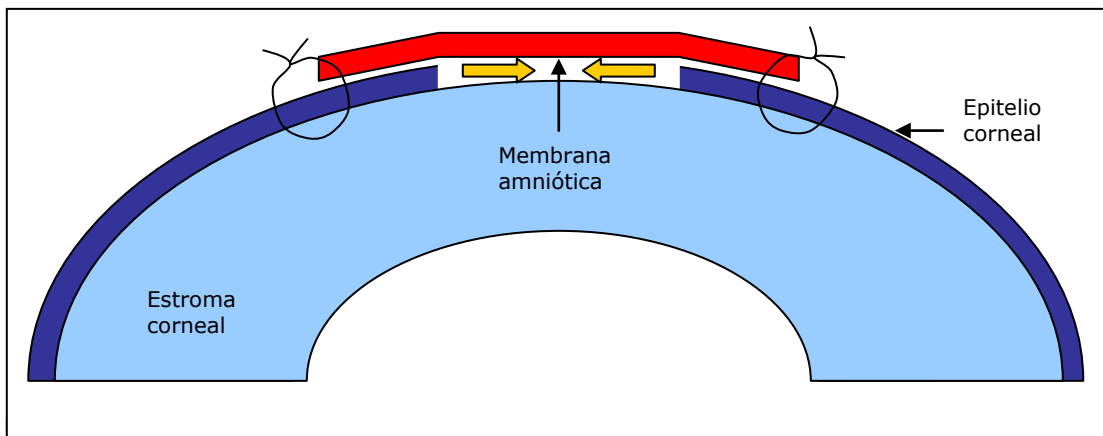


FIGURA 27: Esquema del implante de membrana amniótica según la técnica de parche-recubrimiento.

1.4.2 QUERATOPLASTIA PENETRANTE:

La queratoplastia penetrante consiste en la implantación de un segmento corneal de espesor completo, que proviene de un donante cadáver (aloinjerto) (FIGURAS 28, 29 y 30). Actualmente es la técnica más utilizada, y suele arrojar buenos resultados (*Hyman L et al., 1992*); sin embargo, la existencia de problemas como la escasez de donantes, el rechazo del injerto (figura 31), y la transmisión de enfermedades del donante al receptor obligan a la búsqueda de otras alternativas terapéuticas.

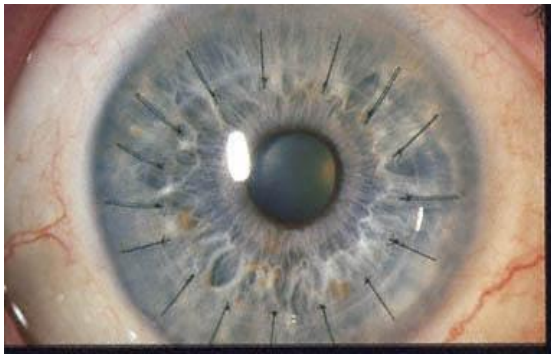


FIGURA 28: Queratoplastia penetrante con puntos sueltos. Aspecto a los 6 meses de la cirugía.



FIGURA 29: Queratoplastia con sutura continua. Aspecto a los 7 meses de la cirugía.



FIGURA 30: Aspecto de una queratoplastia penetrante a los 14 meses de su realización. Ya han sido retiradas las suturas.



FIGURA 31: Rechazo crónico de una queratoplastia penetrante.

Una forma sencilla de clasificar la queratoplastia penetrante es la basada en la indicación que la motivó. De esta manera podemos dividir la queratoplastia penetrante en:

A) QUERATOPLASTIA ÓPTICA:

Constituye el 90% de las queratoplastias. Tiene como objetivo la mejora de una agudeza visual disminuída por opacidades corneales. Sus principales indicaciones son la queratopatía bullosa afáquica o pseudofáquica, las opacidades corneales tras queratitis infecciosa, traumatismos, el fracaso de un injerto previo, las distrofias corneales

estromales y endoteliales, las degeneraciones corneales, las opacidades corneales congénitas y las ectasias corneales (*Hyman L et al., 1992*). En países desarrollados, las principales indicaciones son el queratocono, la queratopatía bullosa pseudofáquica y la distrofia de Fuchs; por el contrario, en países subdesarrollados, las principales indicaciones son los leucomas secundarios a queratitis infecciosas, traumatismos y malnutrición crónica (*Patel NP et al., 2000*).

B) QUERATOPLASTIA TECTÓNICA O RECONSTRUCTIVA:

Su objetivo es restaurar la estructura corneal. Sus principales indicaciones son: perforación o adelgazamiento corneal, queratocono, queratoglobo, degeneración marginal pelúcida y traumatismos.

C) QUERATOPLASTIA TERAPÉUTICA:

Indicada en queratitis infecciosas de diversa etiología que no responden a tratamiento médico, para eliminar el foco infeccioso.

D) QUERATOPLASTIA COSMÉTICA:

Su finalidad es restaurar la apariencia normal en un ojo amaurótico de aspecto antiestético.

1.4.3 QUERATOPLASTIA LAMELAR:

La queratoplastia lamelar supone el reemplazo del tejido corneal dañado por tejido corneal libre de patología de donante cadáver, dejando intacto el tejido corneal sano (*Barraquer JL, 1972*).

Este tipo de cirugía se reserva para patología corneal estromal media y profunda sin alteraciones endoteliales o bien para aquellas patologías en las que la alteración asienta en el endotelio. Así pues, se distinguen dos tipos de queratoplastia lamelar:

A) QUERATOPLASTIA LAMELAR ANTERIOR:

En la queratoplastia lamelar anterior se sustituye el tejido corneal anterior (FIGURAS 32 y 33). Esta técnica ofrece ciertas ventajas en relación a la queratoplastia penetrante, derivadas en su mayoría de la no penetración en cámara anterior y entre las que destacan un menor riesgo de catarata, glaucoma y sobre todo endoftalmitis. Sin embargo, presenta algunos aspectos oscuros en comparación con el trasplante de córnea de grosor completo como son una mayor complejidad técnica y un peor resultado funcional puesto que con frecuencia se genera una opacidad en la interfase que limita la agudeza visual final (Melles GR et al., 1999). A su vez puede ser: a) Superficial, si se sustituye solamente el tejido estromal anterior (FIGURA 34) (Hafezi F et al., 2003). Esta técnica está indicada en trastornos corneales que afecten a las 300 μm superficiales de la córnea, sobre todo en complicaciones de cirugía refractiva, leucomas y distrofias corneales anteriores, y b) profunda, si se sustituye todo el tejido estromal respetando la membrana de Descemet y el endotelio (FIGURA 35) (Melles GR et al., 1999). Indicada principalmente en los trastornos corneales con un endotelio sano, como queratoconos, distrofias estromales o leucomas profundos de diversa etiología.



FIGURA 32: Diseción manual del *flap* corneal durante una queratoplastia lamelar anterior.

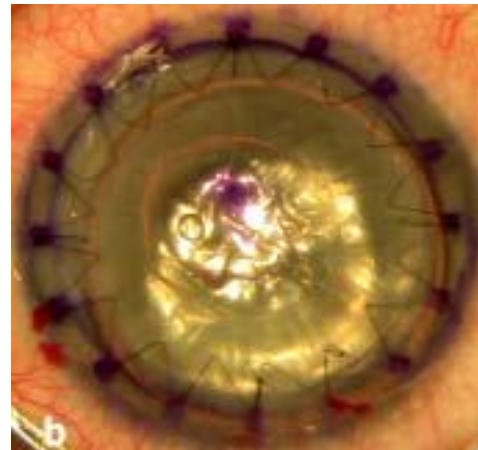


FIGURA 33: Aspecto del mismo ojo al término de la cirugía.

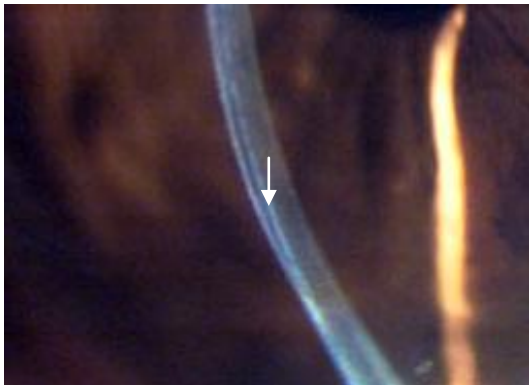


FIGURA 34: Queratoplastia lamelar anterior superficial observada en la lámpara de hendidura. Puede apreciarse la interfase entre córnea donante y receptora (flecha).

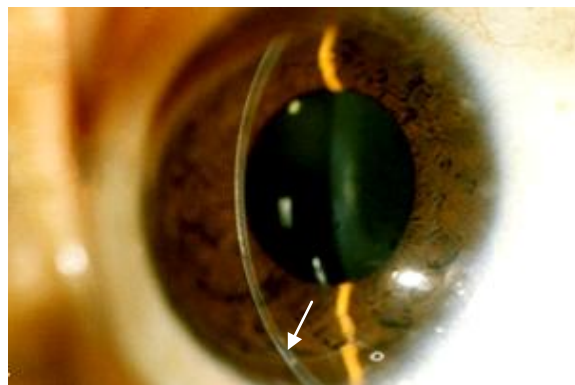


FIGURA 35: Queratoplastia lamelar anterior profunda evaluada con lámpara de hendidura. Es visible un cierto grado de opacidad a nivel de la interfase, más visible en la zona inferior (flecha).

B) QUERATOPLASTIA LAMELAR POSTERIOR (*Melles GR et al., 2000*) (*Terry MA y Ousley PJ, 2003*):

Es la sustitución del tejido corneal posterior incluyendo el endotelio (FIGURAS 36, 37 y 38). Esta técnica está indicada principalmente en los trastornos corneales en los que existe un fracaso endotelial (descompensación endotelial a/pseudofáquica y distrofias endoteliales).

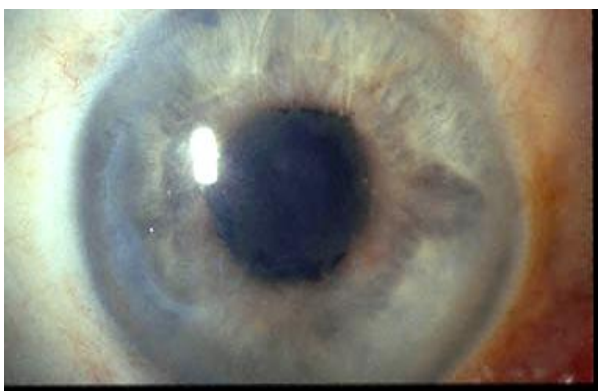


FIGURA 36: Descompensación endotelial tras cirugía de catarata e implante de lente en cámara posterior. Se detecta un importante deslustramiento de la córnea fruto del edema corneal.



FIGURA 37: Aspecto al término de una queratoplastia lamelar posterior. Puede apreciarse la burbuja de aire que se introduce al término de la cirugía para fijar el injerto.

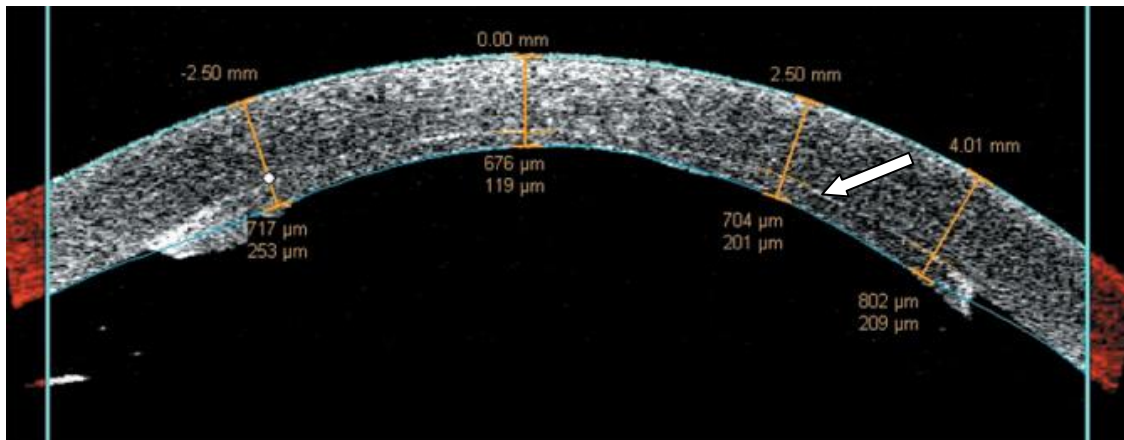


FIGURA 38: Utilidad de la tomografía de coherencia óptica en el seguimiento de las queratoplastias lamelares posteriores. Puede estudiarse la correcta ubicación del injerto, su grosor, así como la interfase (flecha).

1.4.4 QUERATOPRÓTESIS:

Son sustitutos corneales artificiales no biológicos. Existen dos tipos de queratoprótesis:

A) TEMPORALES:

Utilizadas en la cirugía vitreoretiniana en pacientes con opacidades corneales que impiden la visualización del segmento posterior. Estas prótesis se colocan al empezar la cirugía para poder tener una correcta visualización del polo posterior y una vez terminada la misma se retiran y se procede a la queratoplastia penetrante. Pueden ser de polimetilmetacrilato (ej. queratoprótesis de Landers-Foulks) o de silicona (ej. queratoprótesis de Eckardt) (FIGURA 39) (Eckardt C, 1987).

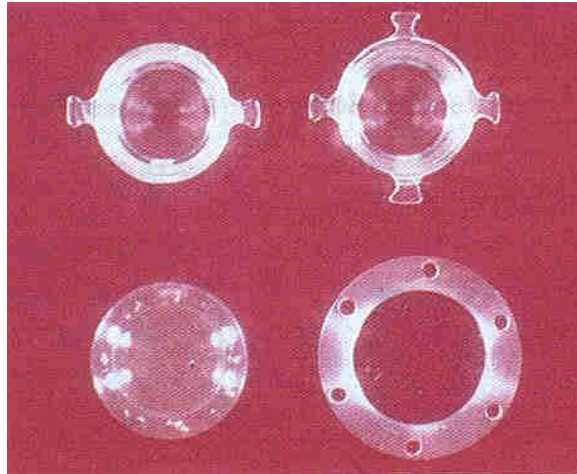


FIGURA 39: Queratoprótesis temporales: Landers 2 y 4 hápticos (arriba). Eckardt (abajo izquierda). Landers de campo amplio (abajo derecha).

B) PERMANENTES:

Pueden proporcionar buena agudeza visual pero tienen el inconveniente de ofrecer un campo visual muy limitado. Se suelen indicar en casos con mala respuesta a la queratoplastia penetrante, como rechazos repetidos del injerto, o déficit bilateral de células madre limbares (*Yaghouti F et al., 2001*). Su principal problema consiste en la imposibilidad de las células epiteliales corneales del receptor para colonizar y adherirse a la prótesis, lo que conlleva un elevado porcentaje de extrusión de la prótesis, lo cual suele ocurrir entre los 5-10 años del implante. Otras posibles complicaciones son la aparición de endoftalmitis, glaucoma y la formación de una membrana detrás de la prótesis que limite la agudeza visual.

Existen multitud de queratoprótesis permanentes, como son las prótesis de cristal, las osteodontoprótesis con óptica rígida de PMMA (polimetilmetacrilato) (FIGURA 40), diversas prótesis de PMMA que incorporan alrededor una camisa porosa biocompatible. Una de las últimas en aparecer es una prótesis con óptica flexible de PHEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)), ideada por Chirila y colaboradores, llamada AlphaCor y cuya cirugía de implante se ilustra a continuación (*Hicks CR et al., 2006*) (FIGURA 41).

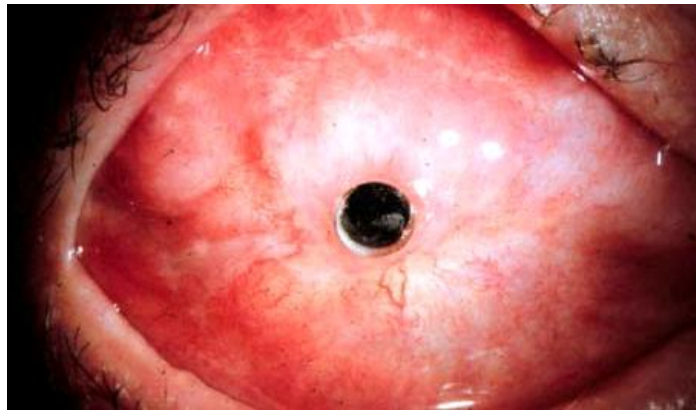


FIGURA 40: Osteodontoprótesis. Es una prótesis biológica con una óptica de PMMA rodeada de diente y hueso y ligamento alveolar del propio paciente.

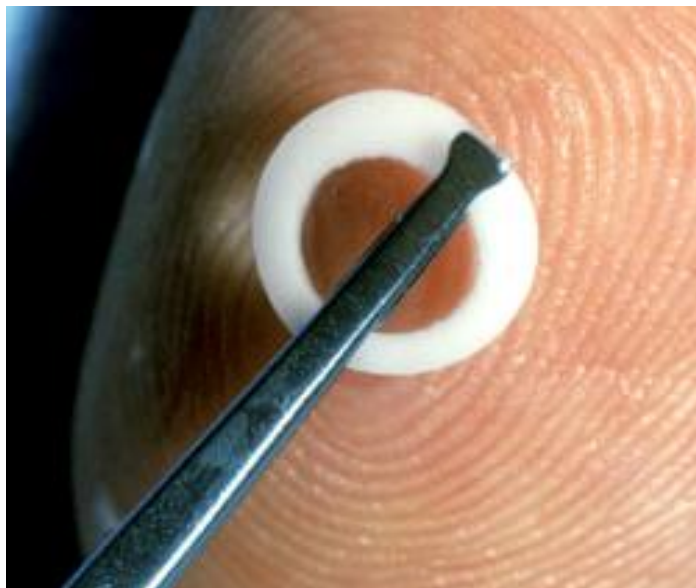
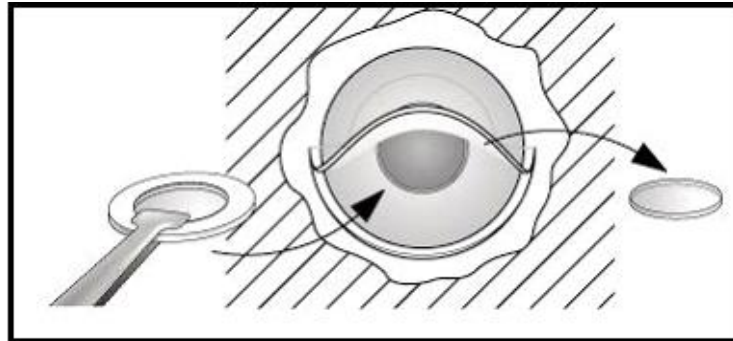


FIGURA 41: Queratoprótesis AlphaCor (Prótesis de Chirila). Se trata de una queratoprótesis biocompatible fabricada con un hidrogel de PHEMA. En la página siguiente se muestra el proceso de implante de esta prótesis.

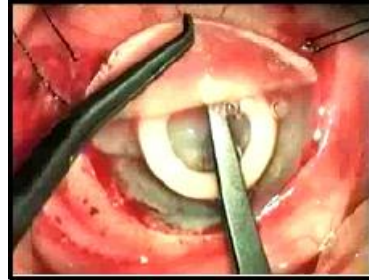
FASE I: Esquema de la creación del bolsillo intraestromal donde irá ubicada la prótesis y de la trepanación del estroma central posterior.



Trepanación de la lamela corneal posterior.

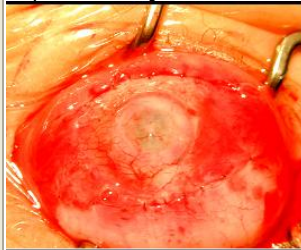


Introducción de la prótesis en el bolsillo estromal.

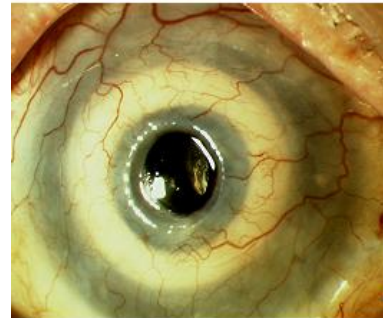


A continuación se sutura el flap corneal y se realiza un recubrimiento conjuntival o con membrana amniótica.

Aspecto del ojo al término de la fase I:



FASE II: La fase II tiene lugar transcurridos 2 meses desde el implante de la prótesis.



Aspecto al inicio de la fase II.

Aspecto al término de la fase II.

2. EL LIMBO ESCLERO-CORNEAL:

2.1 INTRODUCCIÓN:

El limbo constituye la zona de transición entre la córnea y la esclerótica. A pesar de este carácter de transición resulta una estructura imprescindible para el globo ocular, como se puede deducir de sus funciones y como puede observarse en pacientes con insuficiencia límbica parcial o total.

2.1.1 FUNCIONES DEL LIMBO ESCLERO-CORNEAL:

A) RENOVACIÓN Y REPARACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL:

Gracias a la presencia de células madre en las capas basales del epitelio límbico (*Tseng SCG, 1989*).

B) NUTRICIÓN DE LA PERIFERIA CORNEAL:

La red vascular pericorneal formada por los vasos sanguíneos de la lámina propia de la conjuntiva limbar es la encargada de irrigar la periferia de la córnea.

C) MANTENIMIENTO DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO):

Puesto que en el ángulo irido-corneal se sitúa el sistema de drenaje del humor acuoso.

D) BARRERA QUE IMPIDE LA CONJUNTIVALIZACIÓN CORNEAL:

La conjuntivalización corneal no es otra cosa que la asociación de

un epitelio con un fenotipo conjuntival y neovascularización corneal a nivel estromal. Se han descrito dos factores fundamentales que evitan el fenómeno de conjuntivalización de la superficie corneal, que son, de un lado, la presencia de células madre a nivel del epitelio del limbo esclero-corneal y de otro, la existencia de una membrana basal íntegra bajo el epitelio corneal.

E) RESPONSABLE DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A NIVEL CORNEAL:

Reacciones que son el origen de los rechazos agudos, subagudos y crónicos en pacientes sometidos a queratoplastia penetrante o lamelar o trasplante de limbo. (*Forrester JV et al., 2002*)

2.2 ANATOMÍA:

Se trata de una banda circular de unos 2 mm de ancho y 1 mm de espesor situada alrededor de la córnea (FIGURA 42). El límite con la córnea constituye la *transición limbo-corneal* y el límite con la esclerótica la *transición limbo-escleral*. En la cara exterior del limbo existe un surco poco profundo que es el *surco escleral externo*. La superficie interna del limbo está bañada por el humor acuoso y a este nivel se encuentra el *surco escleral interno* donde se disponen las trabéculas del sistema o red trabecular. En la zona posterior del surco escleral interno la esclera forma un resalte circular que es el *espolón escleral*, que constituye la fijación posterior del sistema trabecular y la unión con el cuerpo ciliar.

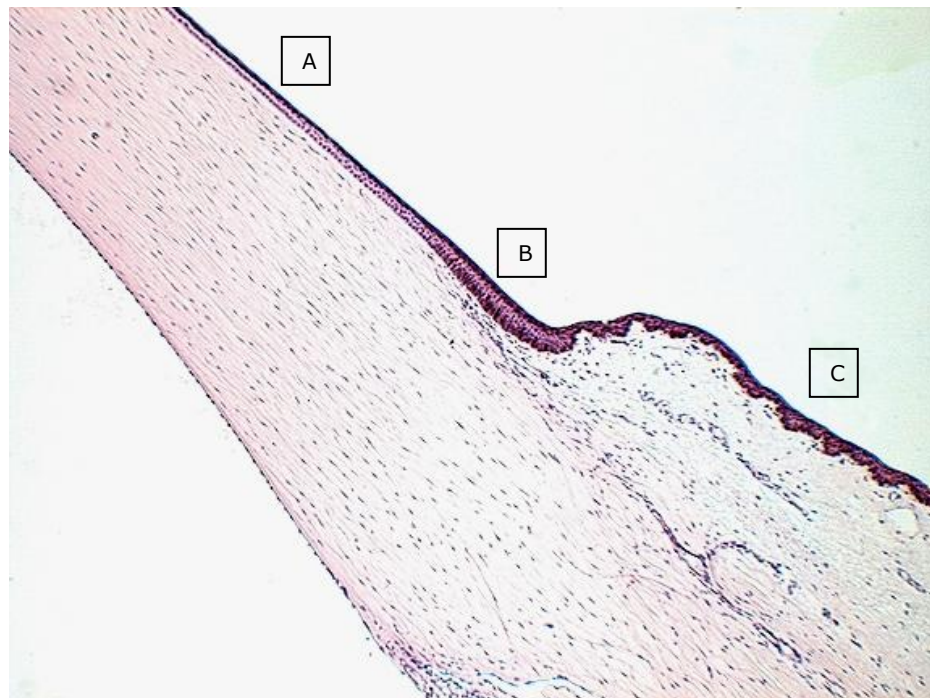


FIGURA 42: Muestra humana teñida con hematoxilina-eosina que incluye córnea, limbo esclero-corneal y esclerótica donde son fácilmente distinguibles el epitelio corneal (A), el epitelio límbico (B) y el epitelio de la conjuntiva (C).

2.3 HISTOLOGÍA:

El limbo se compone de varias estructuras, que de anterior a posterior son: conjuntiva límbica, cápsula de Tenon, lámina epiescleral, estroma límbico y aparato de drenaje del humor acuoso (sistema o red trabecular y seno venoso de la esclerótica o canal de Schlemm) (FIGURA 43).

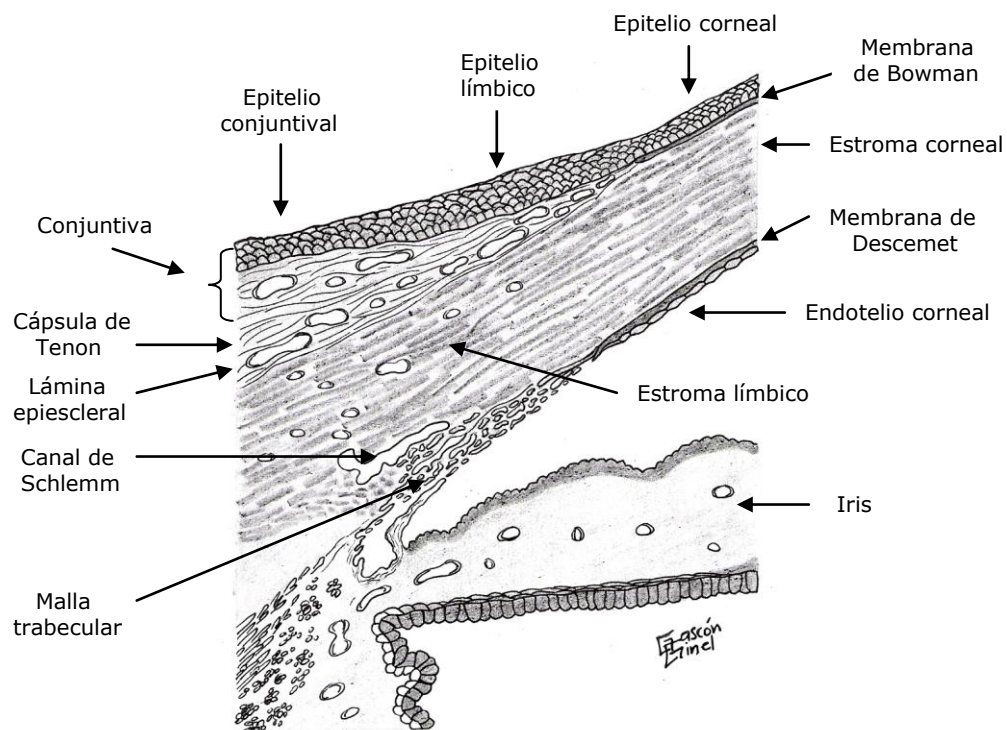


FIGURA 43: Esquema del limbo esclero-corneal y del ángulo irido-corneal.

2.3.1 CONJUNTIVA LÍMBICA:

La conjuntiva límbica se compone de un epitelio y de una lámina propia o estroma. El epitelio límbico, que descansa sobre una membrana

basal rica en colágeno tipo IV, es similar al corneal pero con un mayor número de capas celulares (más de 10 capas en el caso de la conjuntiva límbica y 5-8 capas en epitelio corneal). Esta membrana basal presenta un aspecto ondulado que da lugar a la formación de unas estructuras papilares a este nivel. Estas estructuras son las llamadas empalizadas límbicas de Vogt (*Davanger y Evensen, 1971*). Se trata de unas formaciones pigmentadas, por la presencia de melanocitos en la capa basal del epitelio límbico, más abundantes en el limbo superior e inferior (*FIGURAS 44 y 45*), y que se caracterizan por la existencia de células madre entre sus células basales (*Tseng SCG, 1989*). Estas células madre no expresan citoqueratina K3 ni K12 pero cuando el epitelio corneal lo precisa sufren un fenómeno de división asimétrica por el que de cada célula madre se origina una célula que permanece como reserva (célula madre) y una célula amplificadora transitoria que mientras se desplaza centripetamente hacia el centro de la córnea sufrirá un fenómeno de diferenciación celular expresando ahora esas citoqueratinas K3 y K12 que identifican a las células del epitelio corneal (*Chen WYW et al., 1994*) (*FIGURAS 46 y 47*).

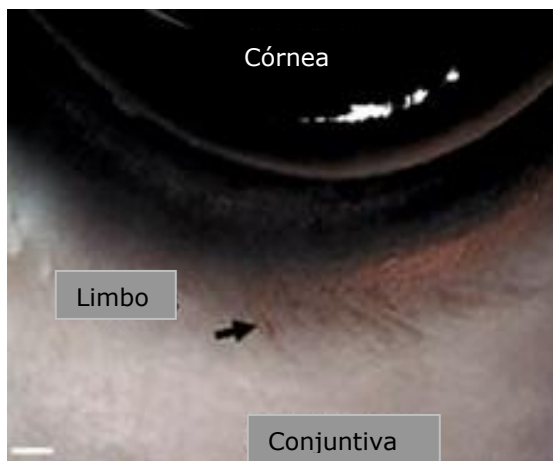


FIGURA 44: Limbo esclero-corneal: Aspecto macroscópico. La flecha señala las empalizadas límbicas de Vogt, más abundantes en el limbo superior e inferior y más pigmentadas en individuos de raza oscura.

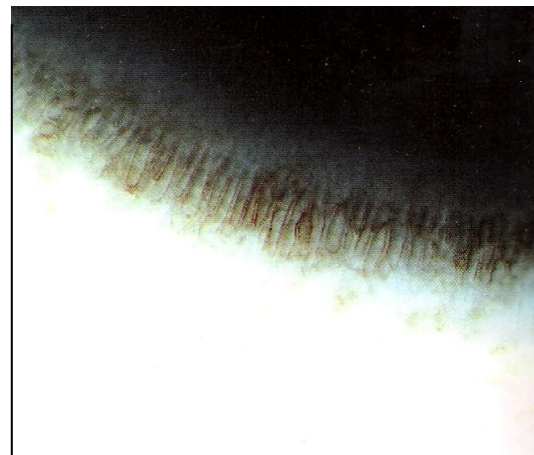


FIGURA 45: Imagen a mayor aumento de las empalizadas límbicas de Vogt.

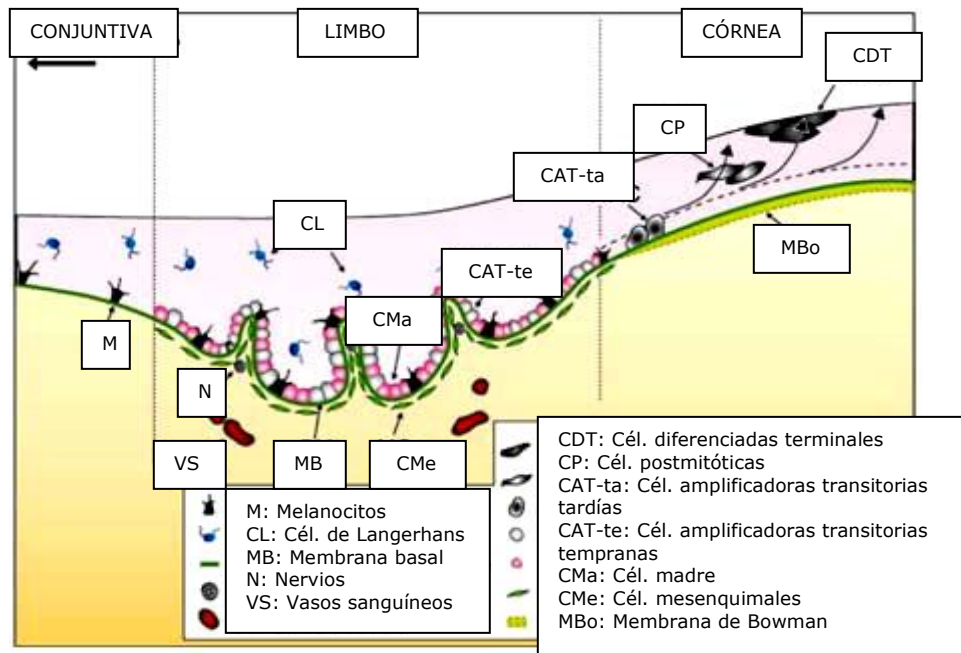


FIGURA 46: Esquema de la estructura del epitelio del limbo esclero-corneal. En el esquema se muestra el proceso de división asimétrica de las células madre limbares por el que, cuando es necesario, cada célula madre da lugar a una célula que permanece como célula madre y a una célula amplificadora transitoria temprana que continúa el proceso de diferenciación celular (célula amplificadora transitoria temprana → célula amplificadora transitoria tardía → célula postmitótica → célula diferenciada terminal).

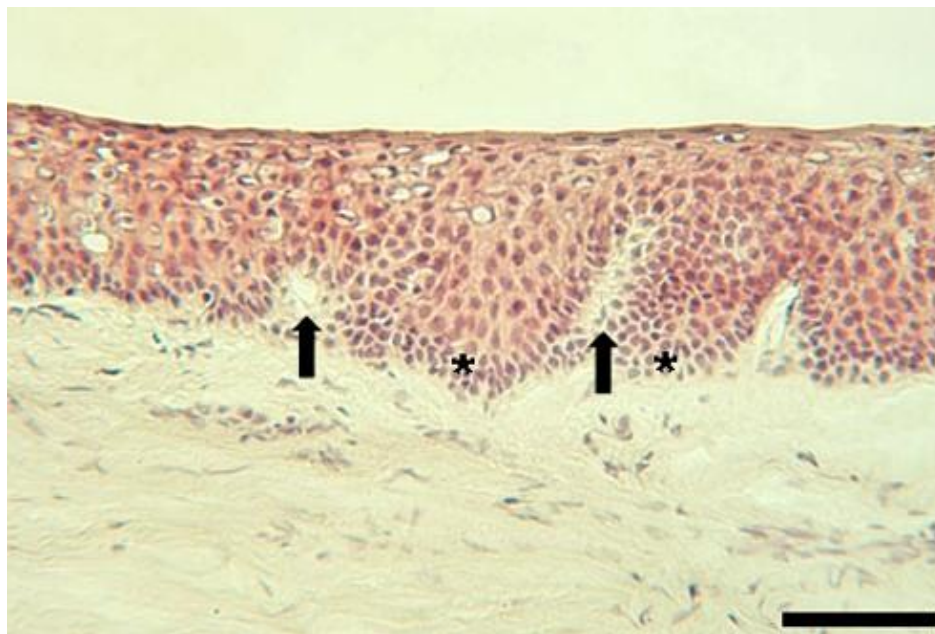


FIGURA 47: Muestra de limbo humano teñida con hematoxilina-eosina y observada al microscopio óptico. Las flechas marcan las invaginaciones a nivel de la membrana basal del epitelio límbico que conforman las empalizadas límbicas de Vogt. Los asteriscos marcan la localización de las células madre limbares dentro de las empalizadas. La barra de escala indica 100 μ m.

La lámina propia es un tejido fibrovascular cuyos vasos forman la red de asas capilares del borde de la córnea, que irriga la parte periférica de la misma.

2.3.2 CÁPSULA DE TENON:

Tejido conectivo denso.

2.3.3 LÁMINA EPIESCLERAL:

No es más que una delgada capa de tejido conectivo denso situada entre la cápsula de Tenon y el estroma límbico.

2.3.4 ESTROMA LÍMBICO:

Es una transición entre el estroma corneal y escleral.

2.3.5 APARATO DE DRENAJE DEL HUMOR ACUOSO (RED O SISTEMA TRABECULAR Y SENO VENOSO DE LA ESCLERA):

Se sitúa en el ángulo irido-corneal. A este nivel se dispone una red de trabéculas anastomosadas que se fijan en su parte anterior a la membrana de Descemet y en su parte posterior al espolón escleral y al cuerpo ciliar (*red trabecular del limbo esclero-corneal*). Las trabéculas están revestidas por las células trabeculares, que son una continuación del "endotelio" de la córnea (FIGURA 48). La otra estructura que forma parte del aparato de drenaje es el *seno venoso de la esclera o canal de Schlemm*. Se trata de un canal

anular, revestido por endotelio vascular, situado en la profundidad del surco escleral interno y del que parten 25-35 conductos colectores que drenan la mayoría hacia el plexo venoso epiescleral (el resto drenan a un plexo escleral profundo y de aquí a ese plexo epiescleral) subsidiario de la vena oftálmica. Este sistema de drenaje constituye la vía de evacuación del 70-90% del humor acuoso, drenándose el resto del humor acuoso hacia la vía uveo-escleral a través del cuerpo ciliar-esclera-venas epiesclerales.

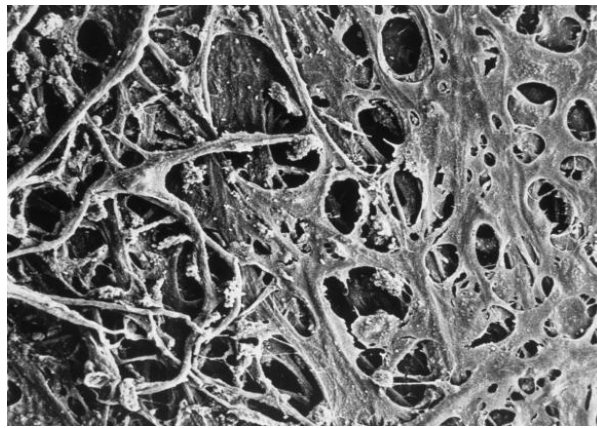


FIGURA 48: Imagen de la malla trabecular humana obtenida mediante MEB.

2.4 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA:

2.4.1 DEFINICIÓN DE INSUFICIENCIA LÍMBICA:

La insuficiencia límbica es el resultado de la destrucción parcial o total de las células madre límbicas debida a diferentes causas que podemos clasificar en primarias (p. ej. aniridia, insuficiencia límbica idiopática, insuficiencia endocrina múltiple, displasias ectodérmicas) o secundarias (p. ej. penfigoide cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, queratoconjuntivitis límbica superior, queratoconjuntivitis atópica, cirugía de la superficie ocular, quemaduras químicas o térmicas, uso prolongado de lentes de contacto y otros traumatismos, déficit de vitamina A, radioterapia). Clínicamente se caracteriza por conjuntivalización corneal (aparición de un epitelio de características conjuntivales a nivel corneal), neovascularización, destrucción de la membrana basal, inflamación crónica y defectos epiteliales (FIGURA 49). El diagnóstico de confirmación de esta entidad se basa en la demostración de células caliciformes así como de un grado variable de metaplasia a nivel del epitelio límbico y corneal mediante citología de impresión (FIGURA 50) (Dua HS et al., 2000) (Majo F et al., 2006) (Puangsricharern V y Tseng SCG, 1995) (Rodríguez-Ares MT y Touriño R, 2004).

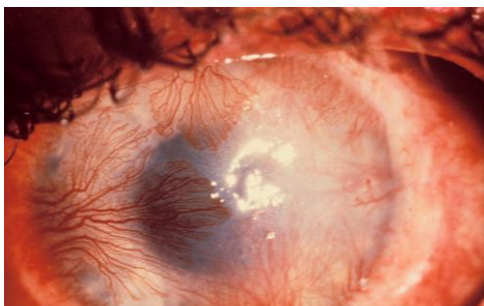


FIGURA 49: Insuficiencia límbica secundaria a quemadura por álcali.

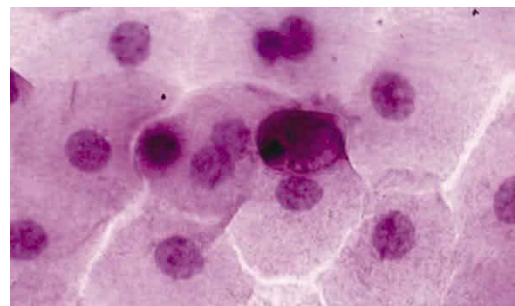


FIGURA 50: Citología de impresión. Puede observarse la presencia de una célula caliciforme entre las células del epitelio límbico.

2.4.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA:

En aquellos casos en que las medidas conservadoras no son suficientes para tratar la insuficiencia límbica se hace necesario recurrir a tratamientos más agresivos. A la hora de decidir cuál es la opción quirúrgica más adecuada en cada situación concreta hay que tener en cuenta una serie de factores entre los que destacan tres: determinar si la insuficiencia límbica es parcial o total; valorar si la patología es uni o bilateral; y finalmente, si existe la posibilidad de encontrar un donante inmunológicamente compatible.

2.4.2.1 IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA:

En pacientes con insuficiencia límbica parcial, la realización de un implante de membrana amniótica puede ser suficiente para resolver el problema. Esto es debido a que la membrana basal del amnios puede, por sí misma, estimular la proliferación de las células madre residuales y restaurar así la superficie ocular (FIGURA 51) (*Tseng SCG et al., 1998*).



FIGURA 51: Tratamiento mediante implante de membrana amniótica de una insuficiencia límbica severa causada por quemadura por álcali.

2.4.2.2 TRASPLANTE DE LIMBO ESCLERO-CORNEAL:

Por el contrario, si el déficit de células madre es total el tratamiento requiere el aporte de nuevas células madre límbicas mediante auto/alotrasplante límbico.

A) AUTOTRASPLANTE LÍMBICO:

Consiste en la extirpación de un segmento de limbo del ojo adelfo sano y su posterior trasplante en el ojo con insuficiencia límbica (FIGURA 52) (Kenyon KR y Tseng SCG, 1989).

Únicamente es posible en casos de insuficiencia límbica unilateral en los que el otro limbo esté libre de patología.



FIGURA 52: Toma de injerto para la realización de un autotrasplante de limbo.

B) ALO/HETEROTRASPLANTE LÍMBICO:

En este caso el limbo o segmento de limbo trasplantado procede de un donante cadáver. Puede ir asociado a una queratoplastia lamelar anterior en el mismo acto quirúrgico (FIGURA 53) o realizarse aislado y en un segundo tiempo hacerse una queratoplastia

penetrante o lamelar anterior si es necesario. Plantea problemas de histocompatibilidad que en un gran porcentaje de casos son causantes de rechazo y fracaso del injerto.

No obstante, hay que indicar que el trasplante mixto de limbo y membrana amniótica parece disminuir la incidencia de rechazo, así como reducir la inflamación, neovascularización y mejorar el microambiente perilímbrico con lo que se obtienen mejores resultados funcionales (Tseng SCG et al., 1998) (Kim JC y Tseng SCG, 1995).

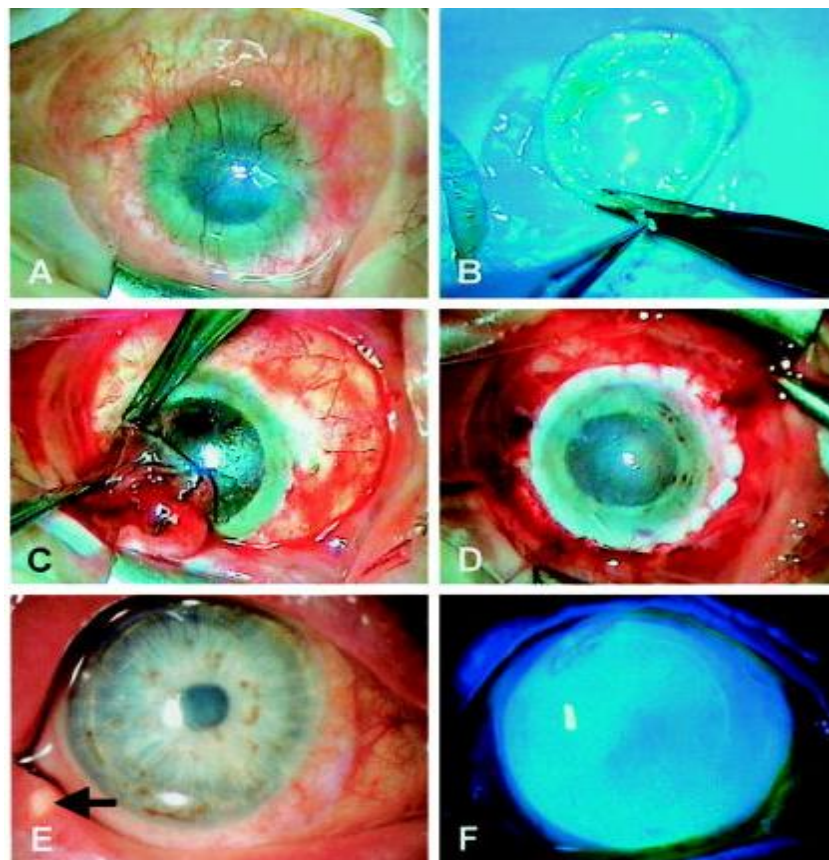


FIGURA 53: Trasplante heterólogo de limbo combinado con queratoplastia lamelar anterior. A: Aspecto inicial del ojo. B: preparación del injerto. C: Extirpación del limbo patológico asociada a queratectomía lamelar. D: Aspecto del ojo al finalizar la cirugía. E: 4 meses tras la cirugía. F: Ausencia de defectos epiteliales a nivel corneal.

2.4.2.3 EXPANSIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE AUTÓLOGAS:

Técnica indicada en casos de insuficiencia límbica unilateral. Mediante este procedimiento, las células madre cultivadas a partir de una biopsia del limbo esclerocorneal contralateral, son implantadas en el ojo enfermo mediante diferentes vehículos, como por ejemplo, membrana amniótica o lentillas de colágeno (Kawashima M et al., 2007) (Kim MK et al., 2005) (Koizumi N et al., 2001) (Ma DH et al., 2004).

Una última opción terapéutica para pacientes con insuficiencia límbica total bilateral, es la utilización de células madre y epitelio de mucosa oral autóloga cultivados sobre membrana amniótica (FIGURAS 54 y 55) (Ang LP et al., 2006) (Nishida K et al., 2004).

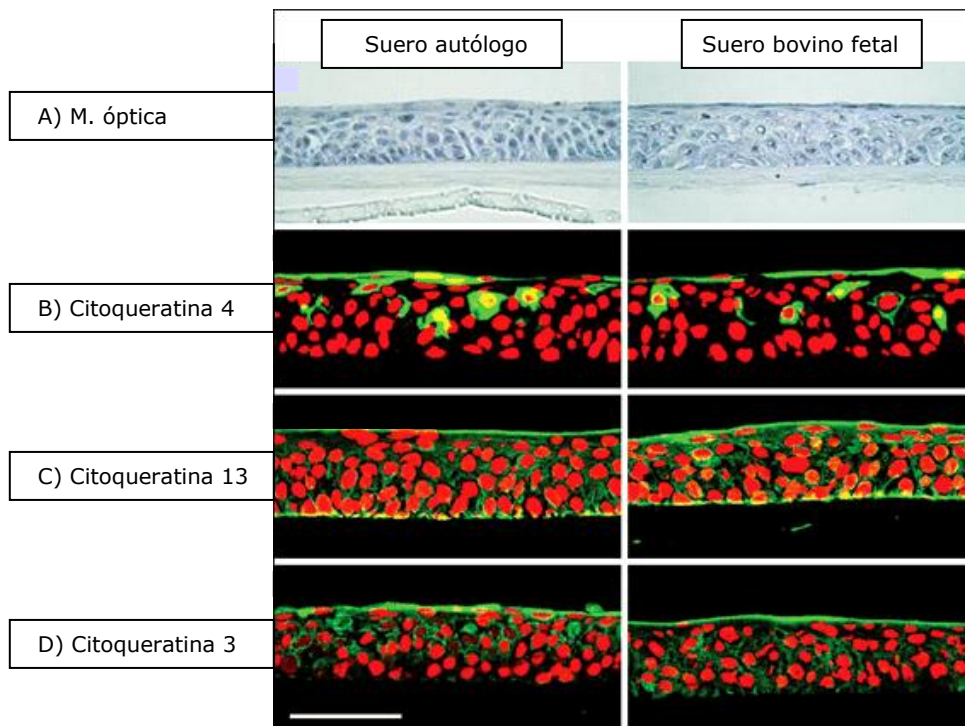


FIGURA 54: A) Microscopía óptica: La mucosa oral cultivada con suero autólogo (izquierda) y con suero bovino fetal (derecha) muestra una histología similar. B-D) Inmunofluorescencia: B) Citoqueratina 4 (específica de mucosa oral): expresión en la mitad superior del epitelio. C) Citoqueratina 13: expresión homogénea en todos los estratos. D) Citoqueratina 3: expresión en todos los estratos del epitelio. La barra de escala indica 100 μm . (Tomado de Ang LP et al., 2006).

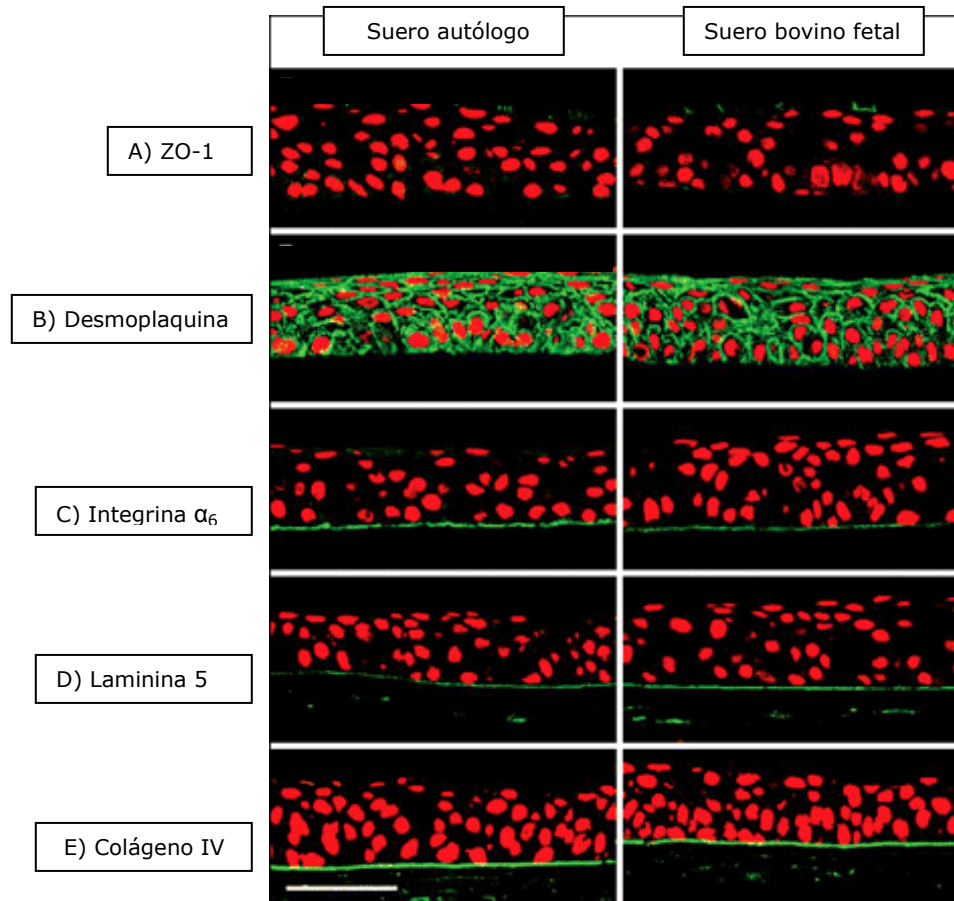


FIGURA 55: Estudio de adhesión celular de mucosa oral cultivada (inmunofluorescencia). No se observan diferencias entre los cultivos enriquecidos con suero autólogo (a la izquierda) y con suero bovino fetal (a la derecha).

A) Expresión de proteína ZO-1 en la superficie del epitelio.

B) Expresión de desmoplaquina en todos los estratos del epitelio.

C-E) Expresión de integrina α_6 (C), laminina 5 (D) y colágeno tipo IV (E) a nivel basal.

La barra de escala indica 100 μm . (Tomado de *Ang LP et al., 2006*).

3. MECANISMOS DE COHESIÓN EPITELIAL:

Una propiedad fundamental del tejido epitelial es su fuerte cohesión intercelular, lo que le permite formar capas adherentes con permeabilidad selectiva y que al mismo tiempo constituyen potentes barreras mecánicas. La cohesión epitelial se lleva a cabo mediante moléculas de adhesión y sistemas de adhesión celular.

3.1 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR:

Las células epiteliales establecen uniones mecánicas y comunicaciones que les permiten relacionarse entre sí. Estas relaciones, que comienzan en el período fetal y se prolongan durante el resto de la vida del individuo, son posibles gracias a la existencia de las moléculas de adhesión celular. Se han identificado cuatro familias de moléculas de adhesión: *la superfamilia de las inmunoglobulinas (CAM), las cadherinas, las selectinas y las integrinas*. Las tres primeras intervienen siempre en fenómenos de adhesión intercelular, mientras que las integrinas pueden mediar tanto uniones intercelulares como uniones de las células con la matriz extracelular que las rodea. Las uniones entre moléculas de adhesión pueden ser de tres tipos: a) uniones homófilas: entre dos moléculas de adhesión de la misma familia. b) uniones heterófilas: entre dos moléculas de adhesión pertenecientes a diferentes familias. c) uniones mediadas por una molécula de adaptación: estas moléculas de adaptación son las lectinas, proteínas fijadoras de hidratos de carbono secretadas por muchos tipos celulares y con capacidad para actuar como intermediarios entre moléculas de adhesión celular.

Las primeras moléculas de adhesión celular identificadas fueron las *moléculas de adhesión celular neural* (NCAM), pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su detección fue posible mediante la obtención de anticuerpos específicos que al unirse a las NCAM del tejido nervioso embrionario impedían la formación de sinapsis. Las NCAM son glucoproteínas del plasmalema cuyas porciones hidrocarbonadas sobresalen hacia el espacio intercelular para unirse ahí con otras NCAM (unión homófila: NCAM con NCAM). Sin embargo, otras moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas como son las ICAM (típicas del endotelio) pueden establecer uniones con las integrinas (uniones heterófilas).

Otro tipo de moléculas de adhesión celular son las *cadherinas*, las cuales reciben su nombre del tejido en el cual se demostraron por primera vez (cadherina E presente sobre todo en el tejido epitelial, cadherina N en el tejido nervioso o cadherina P de la placenta). Son glucoproteínas transmembrana con lugares de unión para unirse a otras cadherinas a nivel del hidrato de carbono. Las cadherinas establecen uniones homófilas, es decir, con otras cadherinas, pero a diferencia de las NCAM, las cadherinas precisan la presencia de iones calcio en el espacio extracelular para que dichas uniones puedan establecerse. El extremo citoplasmático de las cadherinas se encuentra unido a los filamentos intermedios o a los filamentos de actina del citoesqueleto mediante proteínas denominadas cateninas.

Las *selectinas* son moléculas que median sólo fenómenos de adhesión intercelular y, al igual que las cadherinas, son calcio-dependientes.

El último tipo de moléculas de adhesión celular son las *integrinas*. Se trata de proteínas heterodiméricas, constituidas por una subunidad α y una subunidad β , siendo esa subunidad β la que permite su clasificación. Intervienen tanto en fenómenos de adhesión intercelular como en

fenómenos de adhesión a la matriz extracelular (ej. integrina $\alpha_5 \beta_1$: interacción con la fibronectina de la matriz extracelular).

3.2 SISTEMAS DE ADHESIÓN CELULAR:

Las diferentes moléculas de adhesión celular van a contribuir a la cohesión epitelial formando parte de los distintos sistemas de adhesión celular o uniones celulares.

Las uniones intercelulares pueden ser clasificadas según su extensión en (FIGURA 56):

- Uniones tipo zónula: Banda continua que rodea toda la circunferencia de la célula.
- Uniones tipo fascia: Uniones con forma de placa extendida.
- Uniones tipo mácula: Uniones puntuales.

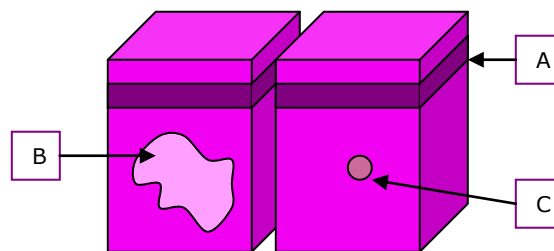


FIGURA 56: Tipos de uniones intercelulares según su extensión. A) Unión tipo zónula. B) Unión tipo fascia. C) Unión tipo mácula.

También pueden ser clasificadas según su función y estructura en:

- Uniones ocluyentes: Las membranas citoplasmáticas de las células enfrentadas se acercan hasta aparentemente fusionarse. Sellan las uniones entre células. Su estructura característica es la zónula ocluyente (*zonula occludens*).

- Uniones de anclaje o adherentes: Unen de forma mecánica las células entre sí (*zonulae adhaerentes*, *fasciae adhaerentes* y *maculae adhaerentes* o desmosomas) o con la matriz extracelular (hemidesmosomas y adhesiones focales).

- Uniones de comunicación: Permiten la comunicación entre dos células adyacentes. A este grupo de uniones intercelulares pertenecen los nexos, también llamados uniones comunicantes o uniones tipo gap (*gap junctions*).

3.2.1 UNIONES OCLUYENTES: ZÓNULA OCLUYENTE (*ZONULA OCCLUDENS*):

Se sitúa en la superficie lateral de la célula epitelial, inmediatamente bajo la superficie libre del epitelio, a modo de cinto que rodea toda la célula (zónula, dim. del latín zona, cinto). Se trata de una banda de unas 0,2 micras de ancho donde las láminas externas de las membranas citoplasmáticas de las células que entran en contacto parecen fusionarse. Por criofractura, método que divide la bicapa lipídica de la membrana celular, se observa un reticulado de crestas sobre la cara protoplasmática y sus correspondientes surcos sobre la cara extracelular. Las crestas están constituidas por unos complejos proteicos, que, al someterse la membrana celular a congelación y fractura, quedan fijados a la cara protoplasmática formando esos cordones. Estos complejos están formados por diversas proteínas entre las que destacan la ocludina, la cingulina, las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3, la cadherina E y cateninas. La parte extracelular de la ocludina guarda relación con otra ocludina y la parte interior se va a relacionar con filamentos de actina del citoesqueleto mediante proteínas intermedias (proteína ZO-1, ZO-2 y ZO-3) (FIGURAS 57 y 58).

La *zonula occludens* constituye una barrera que impide el paso de sustancias a su través, dividiendo funcionalmente a las células epiteliales en un dominio apical y otro basolateral, a la vez que ejerce una función mecánica por la fuerte unión que presentan las células a su nivel.

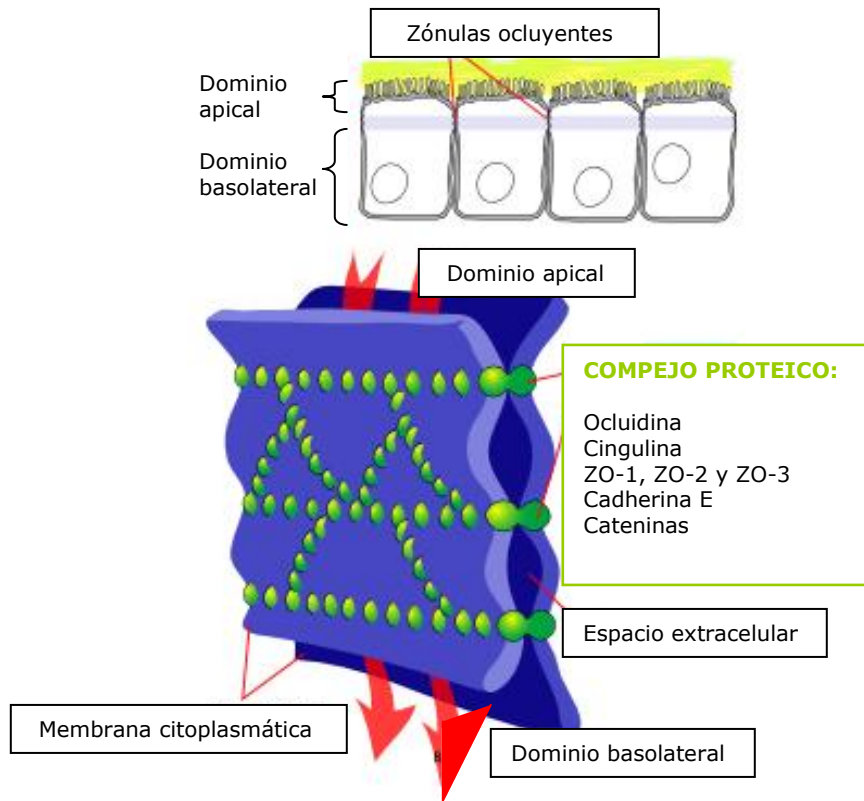


FIGURA 57: Esquema de una *zonula ocluyens* donde se muestra su localización en la célula y su estructura.



FIGURA 58: Imagen por microscopía electrónica de barrido tras someter una muestra de tejido epitelial al proceso de criofractura. Son visibles las microvellosidades (en la mitad superior de la fotografía). Las flechas señalan la zónula ocluyente.

3.2.2 UNIONES ADHERENTES:

3.2.2.1 ZÓNULA ADHERENTE (*ZONULA ADHAERENS*):

Cuando ambas existen en la misma célula, la zónula adherente se sitúa inmediatamente por debajo de la *zonula occludens*. La asociación en la zona apical de una célula epitelial apical de una zónula ocluyente, una zónula adherente y máculas adherentes conforma lo que se conoce como complejo de unión.

A nivel de la zónula adherente existe una separación de unos 15-20 nm entre las membranas citoplasmáticas de las células contiguas. Sobre la superficie interna de cada membrana celular se distingue una placa de densidad moderada constituida por vinculina, cateninas y α -actinina donde se fijan los filamentos de actina del citoesqueleto. La unión intercelular a nivel de la *zonula adhaerens* se establece mediante cadherinas (cadherina E si se trata de un epitelio), proteínas transmembrana cuyos extremos intracelulares se fijan a las cateninas y la vinculina de la placa densa y cuyos extremos extracelulares se unen a los extremos extracelulares de las cadherinas de las células vecinas. La unión entre los extremos extracelulares de las cadherinas depende de la presencia de calcio en el medio extracelular, por lo que si estos iones son eliminados se produce la separación de la *zonula adhaerens* (FIGURAS 59 y 60).

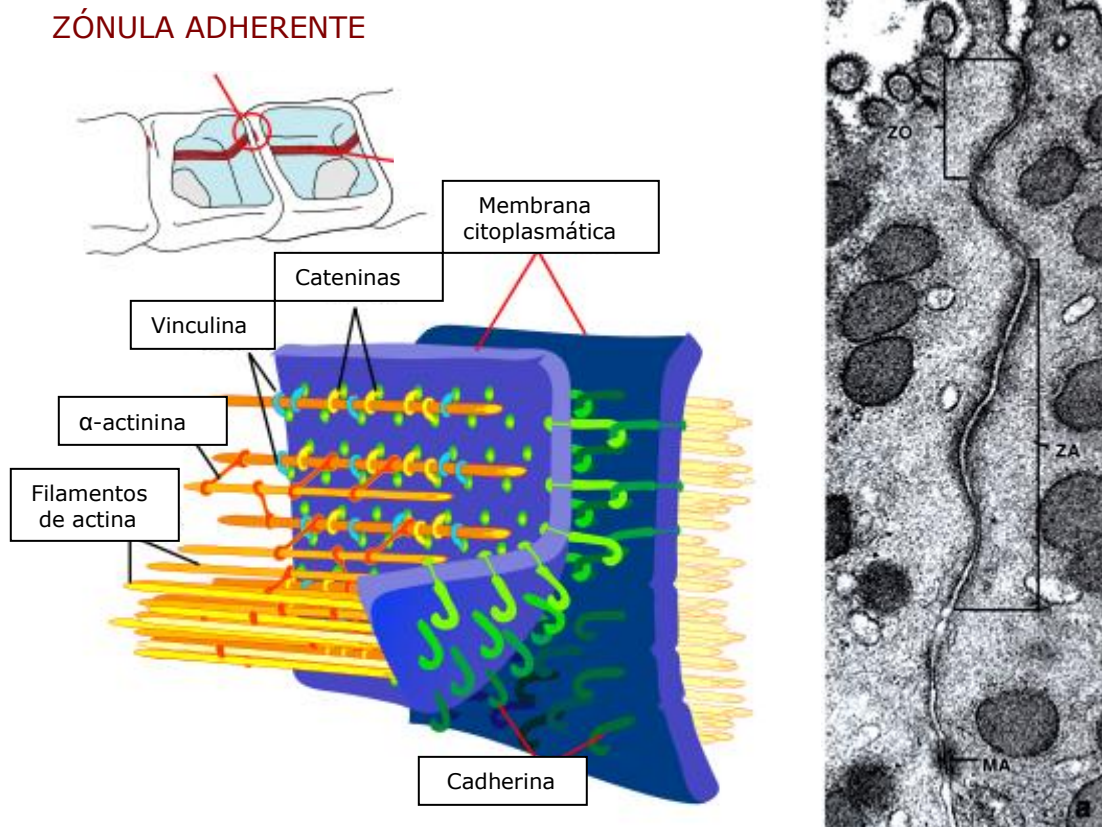


FIGURA 59: A la izquierda, esquema que muestra la estructura de una zónula adherente.

FIGURA 60: A la derecha, fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de un complejo de unión. Pueden identificarse con claridad la zónula ocluyente en la zona superior de la imagen (ZO), la zónula adherente en la zona media de la fotografía (ZA) y una mácula adherente o desmosoma en la zona inferior (MA).

3.2.2.2 FASCIA ADHERENTE (*FASCIA ADHAERENS*):

Estructura similar a la zónula adherente pero con morfología de lámina en lugar de cinto (FIGURA 61). Se encuentra sobre todo en la musculatura cardiaca.

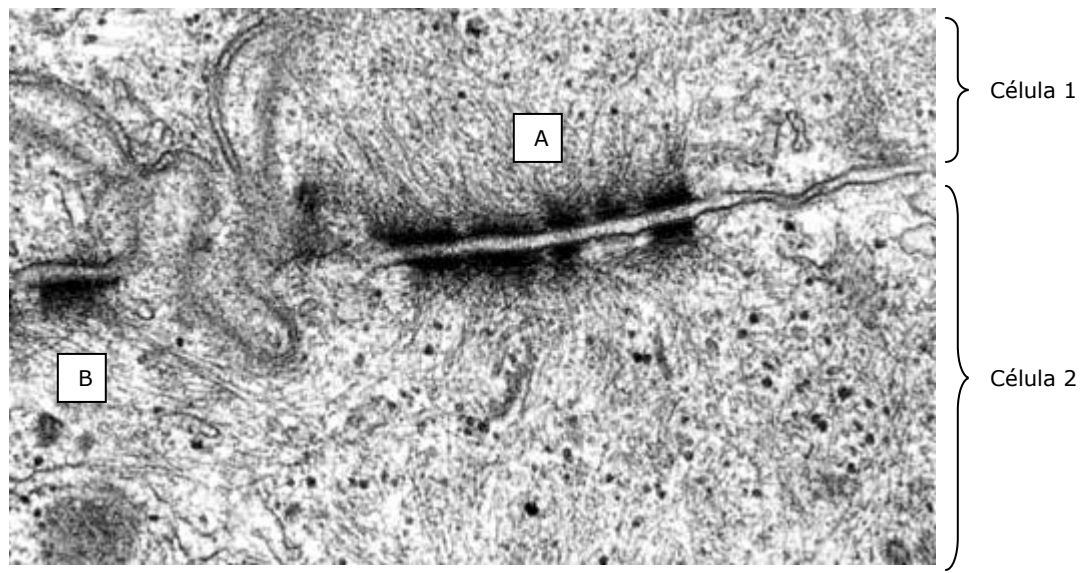


FIGURA 61: Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión en la que pueden observarse dos células epiteliales unidas entre sí por una fascia adherente (A) y por un desmosoma (B).

3.2.2.3 MÁCULA ADHERENTE (*MACULA ADHAERENS*) O DESMOSOMA:

Los desmosomas son estructuras circulares de unas 0,5 micras de diámetro. Pueden aparecer formando parte de los complejos de unión bajo la superficie libre epitelial (asociación de *zonula occludens*, *zonula adhaerens* y desmosomas) o aislados en casi todas las capas epiteliales. En los desmosomas existe un espacio intercelular de unos 20 nm. Sobre la cara citoplasmática de cada membrana celular se observa un material electrodensito en forma de placa (FIGURA 62). Estas placas están constituidas por desmoplaquina (proteína con capacidad para fijarse a los filamentos intermedios del citoesqueleto), placoglobina y placofilina. Los filamentos intermedios (citoqueratina en el caso de las células epiteliales; desmina a nivel muscular) no terminan en la placa sino que se dirigen hacia ella, formando un bucle, para volver a continuación al citoplasma. El último componente del desmosoma lo constituyen la desmogleína y la desmocolina, glucoproteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las cadherinas, que poseen un dominio intracelular que se fija a la placa (unión mediada por

la placoglobina) y un dominio extracelular que se une a los dominios extracelulares de las cadherinas de la célula opuesta (FIGURA 63). Existen tres isoformas de desmogleína y desmocolina, codificadas por genes diferentes: DSG 1, 2 y 3, y DSC 1, 2 y 3. La isoforma 2 de desmogleína y de desmocolina (DSG 2 y DSC 2) está presente en todos los tejidos con desmosomas. Pero, la expresión de algunas de estas proteínas es específica de algunos tipos de epitelio, e incluso de algunas capas celulares del mismo epitelio. Así pues, la isoforma 1 de desmogleína y de desmocolina (DSG 1 y DSC 1) generalmente está restringida al epitelio escamoso, mientras que la desmogleína 3 y la desmocolina 3 (DSG 3 y DSC 3) se expresan preferentemente en las capas basales, asociadas a las células madre del epitelio. De este modo, el epitelio corneal expresa desmogleína 2 y desmocolina 2, pero al tratarse de un epitelio no queratinizado no expresa la isoforma 1 de estas dos cadherinas, ni tampoco la isoforma 3 de desmogleína y desmocolina, la cual se encuentra restringida a los estratos basales del epitelio límbico que es donde residen las células madre (*Schäfer S et al., 1994*) (*Messent AJ, et al., 2000*).

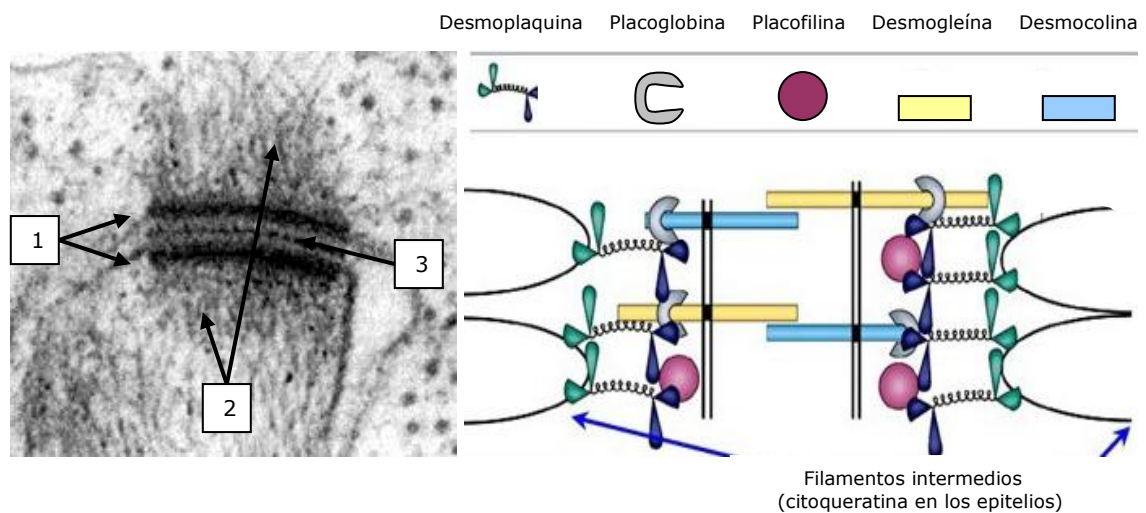


FIGURA 62: Izquierda: Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de un desmosoma donde se identifica la placa densa (1), los filamentos de citoqueratina del citoesqueleto (2) y una línea densa en el espacio intercelular correspondiente a las cadhaerinas del desmosoma (desmogleína y desmocolina) (3).

FIGURA 63: Derecha: Representación esquemática de un desmosoma.

3.2.2.4 ADHESIÓN FOCAL:

Las adhesiones focales relacionan la célula con fibronectina de la matriz extracelular. En la membrana celular se encuentra un receptor para la fibronectina. Se trata de una proteína transmembrana, perteneciente a la familia de las integrinas, que en su porción extracelular tiene un locus de unión para la fibronectina y en su porción intracelular se une a la talina. La talina, junto con la vinculina son las dos proteínas que forman la placa a la que se unen los filamentos de actina en la cara citoplasmática de la adhesión focal (FIGURA 64).

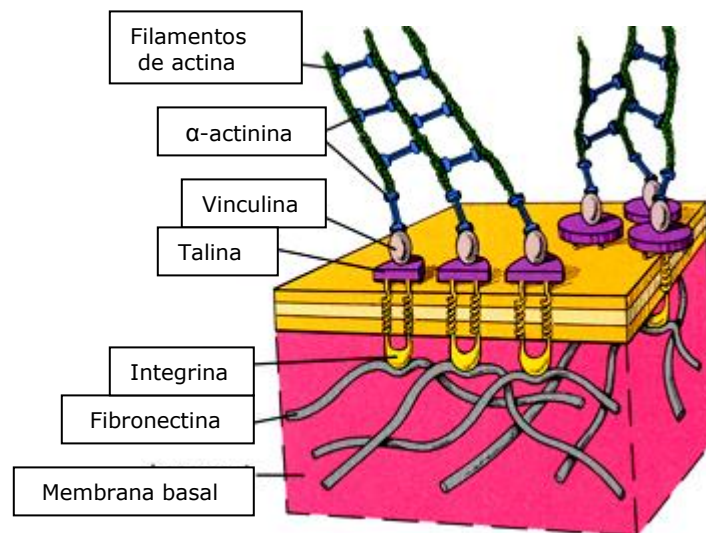


FIGURA 64: Representación esquemática de una adhesión focal.

3.2.2.5 HEMIDESMOSOMA:

Los hemidesmosomas son uniones adherentes que se encuentran en el polo basal del estrato basal de los epitelios. Tienen una estructura parecida al desmosoma pero, al otro lado, la unión se establece con la laminina de la membrana basal. Existe también una placa donde terminan

los filamentos de actina y unas proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las integrinas que se unen por un extremo a la placa y por el otro a la laminina de la membrana basal (FIGURA 65).

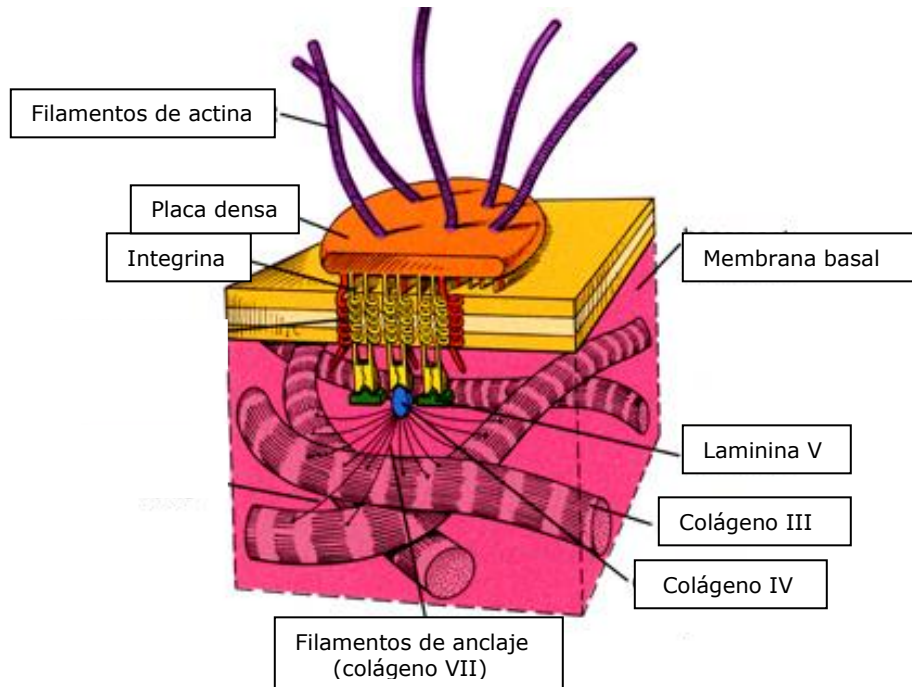


FIGURA 65: Estructura de un hemidesmosoma.

3.2.3 UNIONES DE COMUNICACIÓN: NEXO O UNIÓN COMUNICANTE (GAP JUNCTION):

Contacto intercelular situado en las superficies laterales de las células epiteliales que presentan una hendidura de unos 1,5-2 nm, lo que permite el paso de moléculas hidrosolubles de hasta 100 daltons. Experimentalmente se ha comprobado que el diámetro de este canal es variable, desde el cierre completo hasta la apertura total (ej. puede conseguirse el cierre aumentando la concentración de iones calcio en el espacio extracelular). Las uniones gap se agrupan en fascias de varias micras de extensión. Cada unión gap está formada por dos estructuras hexagonales enfrentadas, denominadas conexones, constituidos cada uno por seis moléculas transmembrana denominadas conexinas (FIGURAS 66 y 67).

Los nexos se encuentran en casi todos los tejidos pero son especialmente abundantes en aquellos tejidos en los que se precisa una comunicación intercelular muy rápida, como son el tejido nervioso y el tejido muscular cardiaco y liso.

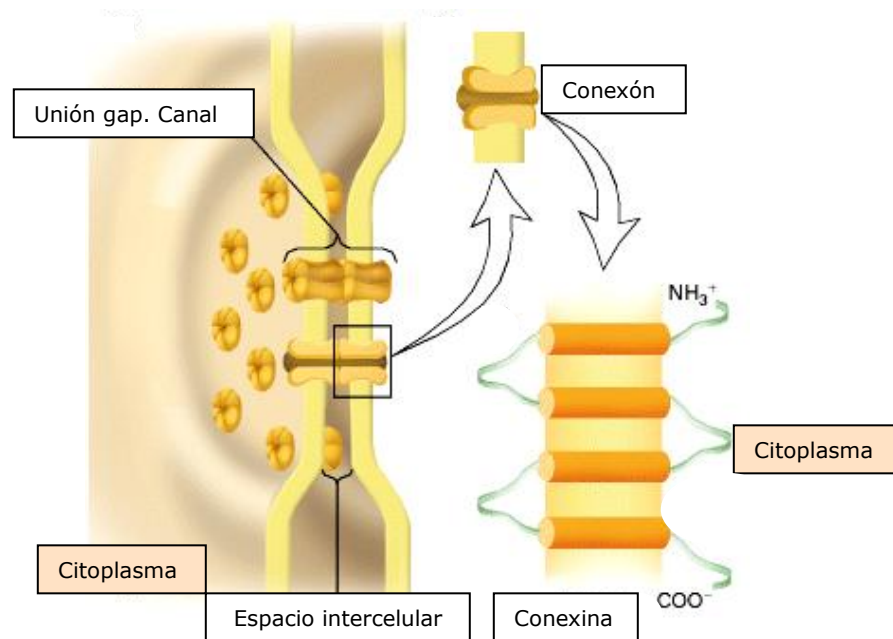


FIGURA 66: Representación esquemática de una unión GAP.

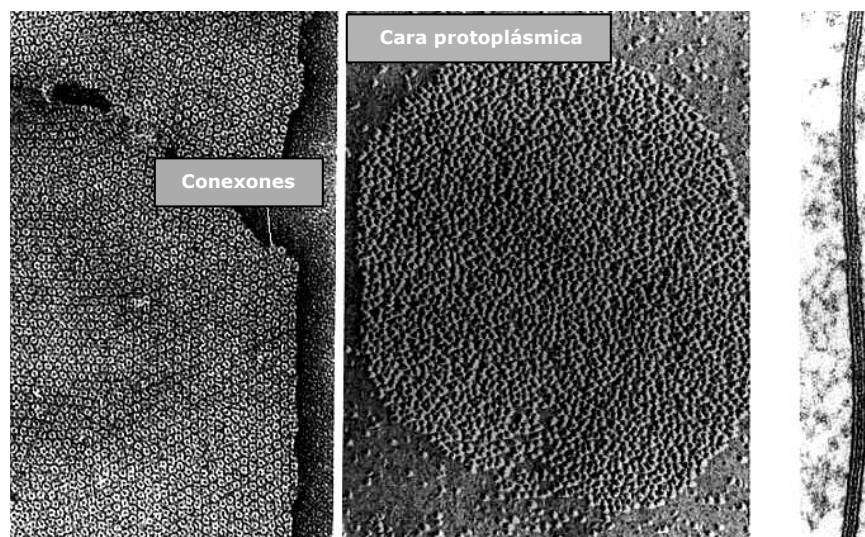


FIGURA 67: A la izquierda, dos imágenes por microscopía electrónica de barrido tras criofractura de una unión GAP. A la derecha, corte transversal por microscopía electrónica de transmisión de una unión GAP.

4. INGENIERÍA TISULAR:

4.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE INGENIERÍA TISULAR:

4.1.1 INGENIERÍA TISULAR Y EQUIVALENTES TISULARES:

El término Ingeniería Tisular fue acuñado durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de Estados Unidos en la primavera de 1987 (*Skalak R y Fox F, 1988*). Se trata de un área científica interdisciplinaria cuyo objetivo es la construcción de tejidos biológicos artificiales y la utilización, con fines médicos, de los mismos para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de tejidos y órganos enfermos. Los tejidos artificiales así fabricados son los llamados equivalentes tisulares (*Campos A, 2004*) (*Langer R y Vacanti JP, 1993*) (*Nerem RM y Sambanis A, 1995*).

La creación a demanda de estos equivalentes tisulares o prótesis biológicas mediante Ingeniería Tisular precisa de tres elementos:

- 1) El desarrollo de cultivos celulares a partir de células madre.
- 2) La creación de matrices en las cuales se desarrollen estas células.
- 3) La obtención de factores de crecimiento y de diferenciación celular (*Bell E, 1995*).

Se trata de una disciplina floreciente, cuya rápida expansión viene condicionada por diversos factores como son las largas listas de espera para el trasplante de distintos órganos humanos y la escasez de donantes, el riesgo de rechazo del injerto que obliga a la utilización de tratamientos inmunosupresores con el peligro de contraer infecciones y desarrollar

neoplasias que éstos conllevan, y finalmente, la posibilidad de transmisión de infecciones del donante al receptor.

4.1.2 TECNOLOGÍA CELULAR E INGENIERÍA DE CONSTRUCTOS:

4.1.2.1 TECNOLOGÍA CELULAR:

A la hora de fabricar un equivalente tisular lo primero que necesitamos es una adecuada fuente de células con capacidad de proliferación y libres de microorganismos y de cualquier otro tipo de contaminación.

La principal fuente de células para la Ingeniería Tisular son las células madre, también llamadas células troncales (*stem-cells*). Por célula madre entendemos aquella célula que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional.

Según su procedencia, las células madre pueden clasificarse en:

A) CÉLULAS AUTÓLOGAS:

Proceden del propio paciente, por lo que no producen respuesta inmunológica.

B) CÉLULAS ALOGÉNICAS o HETERÓLOGAS:

Pertenecen a otro individuo de la misma especie, por lo que pueden desencadenar una respuesta inmunológica de rechazo en el receptor.

C) CÉLULAS XENOGÉNICAS o XENÓLOGAS:

Proceden de un individuo de otra especie, por lo que

desencadenan respuestas inmunológicas agudas o hiperagudas y a la vez que obligan a descartar la presencia de virus animales que puedan ser transmitidos al huésped.

Una segunda forma de clasificar las células madre es según su potencialidad, es decir, según su capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. Así pues, podemos hablar de células madre totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (*Prósper F et al., 2006*):

A) TOTIPOTENCIALES:

Las células madre totipotenciales son aquéllas capaces de producir tanto tejido embrionario (cualquiera de los tejidos que conforman el embrión), como extraembrionario (placenta y anejos placentarios). Por tanto, son células capaces de generar cualquier tipo de tejido e incluso pueden dar lugar a un individuo completo.

B) PLURIPOTENCIALES:

Son células madre que también pueden formar cualquier tipo de tejido, pero a diferencia de las anteriores, no pueden formar un organismo completo por sí solas por no poder formar tejidos extraembrionarios.

C) MULTIPOTENCIALES:

Son células madre ya orientadas a la formación de un tipo específico de tejido y que son capaces de generar los distintos tipos de células pertenecientes a la misma familia y a la misma hoja embrionaria. Un ejemplo de células madre multipotenciales lo constituyen las células madre de la médula ósea.

D) UNIPOTENCIALES:

Sólo pueden diferenciarse hacia un tipo específico de células, por ejemplo las células madre del epitelio del limbo esclero-corneal.

Finalmente, las células madre también pueden clasificarse en *embrionarias* y en *adultas* (Khademhosseini A et al., 2006). Generalmente, las células madre embrionarias son aisladas durante la fase de blastocisto a partir de la masa celular interna de embriones, mientras que las adultas se obtienen a partir de las células indiferenciadas de los tejidos adultos. La mayoría de las células madre adultas son multi o unipotenciales. Las células madre aisladas del polo embrionario del blastocisto son células madre pluripotenciales. Para obtener células madre totipotenciales es preciso recurrir a las primeras etapas del desarrollo embrionario, en concreto al período entre cigoto y mórula.

Una vez obtenidas, las células madre deben ser estimuladas para que se repliquen hasta obtener un número suficiente de ellas. Para llevar a cabo este fin es necesaria la obtención de medios de cultivo optimizados para los diversos tipos celulares. En el caso de las células madre toti, pluri y multipotenciales además de estimular su replicación hay que manipularlas para obtener las características funcionales deseadas, es decir, para lograr su diferenciación hacia el tipo celular que necesitemos en cada caso concreto. Esto se puede conseguir mediante la modificación del medio extracelular o por manipulación genética de las células madre (Khademhosseini A et al., 2006) (Solter D y Gearhart J, 1999). El control de la proliferación y de la diferenciación de las células madre es un elemento crucial en la Ingeniería Tisular, tanto para poder obtener poblaciones celulares autólogas con las que elaborar esos equivalentes tisulares como para no inducir la formación de teratomas, teratocarcinomas, ni otro tipo de tumores en el receptor, hecho este último que puede producirse si entre las células trasplantadas se encuentran células que no hayan llevado a cabo correctamente el proceso de diferenciación y se encuentren en un estado indiferenciado en el momento del implante (Kurosawa H, 2007) (Ramírez MA et al., 2007).

4.1.2.2 INGENIERÍA DE CONSTRUCTOS:

Una vez obtenida una fuente útil de células, el siguiente paso es desarrollar un modelo tridimensional (constructo o equivalente tisular), en el cual esas células se organicen en una arquitectura espacial, con características funcionales similares a las del tejido que queremos sustituir. Básicamente, existen tres tipos de constructos (FIGURA 68) (Auger FA et al., 1995) (Griffith LG y Naughton G, 2002) (Khademhosseini A et al., 2006):

A) MATRICES ACELULARES:

Se trata de estructuras acelulares que precisan la colonización por parte de las células del huésped una vez implantadas (FIGURA 68 A).

B) CONSTRUCTOS CON CÉLULAS CULTIVADAS:

En este caso se emplea una matriz extracelular artificial en la cual se cultivan las células madre del tejido que va a ser sustituido (FIGURA 68 B).

C) AUTOMONTAJES CELULARES:

Son las propias células cultivadas las que sintetizan la matriz extracelular que las rodea (FIGURA 68 C).

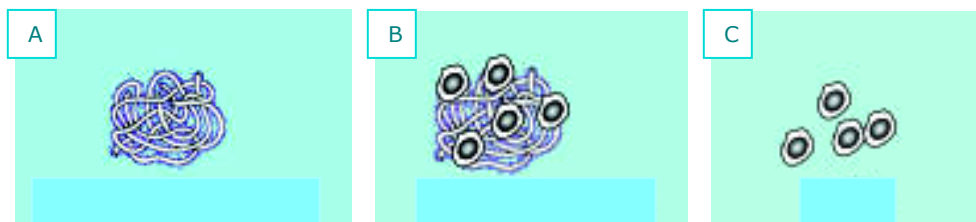


FIGURA 68: Tipos básicos de constructos utilizados en Ingeniería Tisular: A) Matrices acelulares. B) Constructo con células cultivadas. C) Automontajes celulares. (Tomado de Khademhosseini A et al., 2006).

Finalmente, se procede al implante del equivalente tisular en el receptor para el que ha sido fabricado, lo cual puede hacerse en fresco (dentro de los primeros 5 días desde su fabricación) (*Parenteau N, 1999*), o bien puede ser conservado en frío (*Naughton G, 1999*) hasta que llegue el momento idóneo para su implantación.

Para que el constructo se integre con garantías en el ser vivo en el que se implanta debe cumplir unos criterios mínimos de viabilidad y funcionalidad que incluyen la tolerancia inmunológica y la biocompatibilidad. Para evitar el rechazo del injerto por parte del huésped, el constructo debe ser aceptable inmunológicamente, lo cual ocurre siempre que las células son autólogas. Sin embargo, no siempre es posible utilizar células autólogas, siendo necesario en estos casos buscar otras soluciones mediante la ingeniería de aceptación inmunológica. Por ejemplo, es sabido que para que se desencadene una reacción inmune, no sólo debe haber un reconocimiento por parte del huésped de una sustancia considerada como cuerpo extraño, sino que, además, debe existir una señal coestimuladora. En los trasplantes alogénicos, se ha demostrado que esta señal coestimuladora se puede bloquear farmacológicamente, aumentando así las posibilidades de éxito del implante (*Larsen CP et al., 1996*).

La biocompatibilidad significa que el órgano implantado debe adaptarse a la zona receptora y llevar a cabo las funciones específicas de ese tejido sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria local. Una forma de evitar esta reacción inflamatoria independiente de la respuesta inmune es la utilización de matrices constituidas por moléculas integrantes de la sustancia extracelular del tejido que se quiere sustituir (*Falke GF y Atala A, 2000*).

4.2 INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA:

4.2.1 INTRODUCCIÓN:

La escasez de donantes (ya sea por motivos religiosos, culturales o de infraestructura sanitaria), los problemas de rechazo que a veces se presentan en los casos de injertos alogénicos así como la posibilidad de la transmisión de infecciones del donante al receptor, hacen de la búsqueda de un sustituto corneal autólogo una necesidad real.

Cualquier sustituto corneal debe ser capaz de permitir la transmisión y refracción de la luz de manera similar a la que lo hace la córnea humana y a la vez constituir una barrera eficiente frente a los agentes externos. Al mismo tiempo, debe tener una forma y curvatura adecuadas que permitan su implante en el ojo humano. Finalmente debe estar elaborado con unos materiales, ya sean biológicos o no, que no desencadenen una respuesta inmunológica ni inflamatoria en el receptor, ya que esto provocaría el fracaso del sustituto.

Podemos hablar de dos grandes grupos de sustitutos corneales permanentes:

A) QUERATOPRÓTESIS PERMANENTES:

Constan de una zona óptica central fabricada con diversos materiales como cristal, PMMA (polimetilmetacrilato), silicona o diversos geles como el PHEMA (poli[2-hidroxietilmetacrilato]) y una zona periférica compuesta por un material biológico (diente y hueso alveolar circundante o tibia) o biocompatible (PTFE, Dacron, PHEMA...) que permite la migración celular desde el huésped hacia la prótesis para contribuir al anclaje de ésta.

B) EQUIVALENTES O CONSTRUCTOS CORNEALES:

Fabricados mediante Ingeniería Tisular con células corneales cultivadas sobre materiales biológicos (*Duan D et al., 2006*).

4.2.2 QUERATOPRÓTESIS O PRÓTESIS CORNEALES ARTIFICIALES:

La búsqueda de un sustituto corneal artificial se remonta al siglo XVIII. Las primeras tentativas se hicieron con cristal, pero los resultados fueron poco satisfactorios, ya que estas queratoprótesis eran rápidamente extruidas. Más tarde, se utilizaron otros materiales como la celulosa o el polimetilmetacrilato (PMMA) (*Castroviejo R et al., 1969*), pero el elevado porcentaje de extrusiones seguía siendo el principal problema a solventar. El estudio de las queratoprótesis extruidas mostró que los queratocitos y fibroblastos circundantes no conseguían colonizar la periferia de la prótesis y que el epitelio corneal era incapaz de recubrir la superficie de la misma, por lo que el problema se intentó solucionar añadiendo a la prótesis una camisa periférica de un material biológico, surgiendo así las osteodontoqueratoprótesis, o biocompatible que permitiese el desarrollo de este fenómeno de colonización (*Hille K et al., 2005*).

4.2.2.1 QUERATOPRÓTESIS BIOCOMPATIBLES:

Poseen un revestimiento en periferia de un material biocompatible que permite el crecimiento de queratocitos y fibroblastos del receptor en su interior, fortaleciendo así el anclaje de la prótesis (FIGURAS 69 y 70) (*Caiazza S et al., 1988*) (*Pintucci S et al., 1995*).

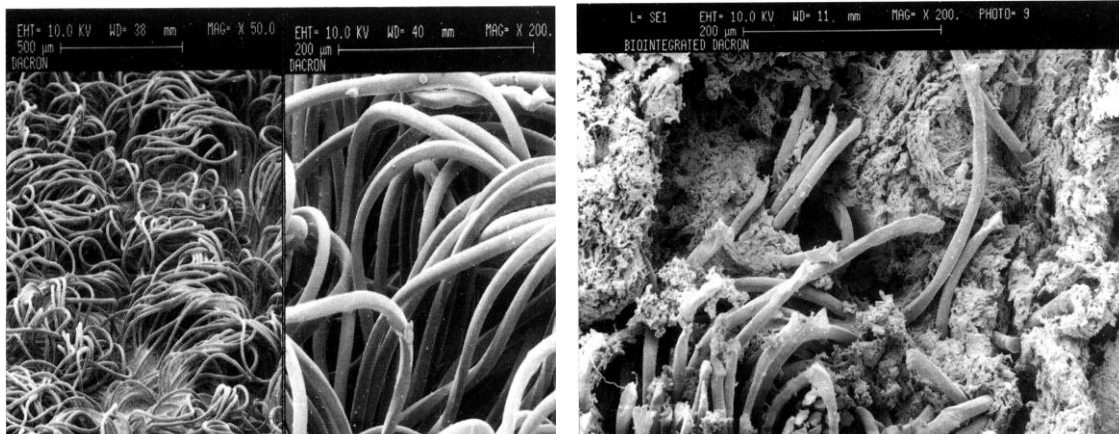


FIGURA 69: Izquierda. Aspecto de las fibras de Dacron al microscopio electrónico de barrido.

FIGURA 70: Derecha. Aspecto, mediante microscopía electrónica de barrido, de las fibras de Dacron tras haber estado 30 días implantadas bajo la piel del párpado inferior en conejo. Puede verse cómo están embebidas en tejido conectivo.

- QUERATOPRÓTESIS DE CARDONA:

Óptica de PMMA rodeada de politetrafluoruro expandido (PTFE) y reforzada con Dacron y tejido autólogo (periostio) (*Cardona H, 1967*).

- QUERATOPRÓTESIS DE LEGEAIS:

Para intentar disminuir el porcentaje de extrusiones ha sufrido dos modificaciones desde su aparición (*Hollick EJ et al., 2006*) (*Legeais JM y Renard G, 1999*).

Legeais BioKpro 1:

Óptica de PMMA de 4 mm de diámetro y 2,67 mm de altura rodeada de una camisa de PTFE de 9 mm de diámetro, 200 μm de espesor y un diámetro de poro de 50 μm .

Legeais BioKpro 2:

Óptica de doble asfericidad de polidimetilsiloxano de 7 mm de diámetro y 0,55 mm de altura. Camisa de PTFE hidrofiliado de 11 mm de diámetro, 250 μm de espesor y 80 μm de diámetro de poro.

Legeais BioKpro 3:

Óptica de silicona de 5 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor.

Camisa de PTFE hidrofiliado de 10 mm de diámetro, 250 μm de grosor y 80 μm de diámetro de poro.

- QUERATOPRÓTESIS DE PINTUCCI:

Consta de una óptica de PMMA de 3,5 mm de diámetro fijada a un anillo de Dacron de 10 mm de diámetro (FIGURAS 71 y 72) (Pintucci S et al., 1996) (Pintucci S et al., 1995).



FIGURA 71: Queratoprótesis de Pintucci preparada para su implante. **FIGURA 72:** Queratoprótesis de Pintucci extruida.

- QUERATOPRÓTESIS ALPHACOR (QUERATOPRÓTESIS DE CHIRILA):

Es una de las últimas queratoprótesis biocompatibles aparecidas. Posee una óptica flexible de gel de PHEMA rodeada de una camisa opaca de hidrogel poroso del mismo material. Es un implante flexible de 7 mm que se coloca en un bolsillo corneal en un primer tiempo y en un segundo tiempo se deja libre la zona óptica (FIGURA 73) (en la FIGURA 41 se describe la técnica de implante detalladamente) (Hicks CR et al., 2003).

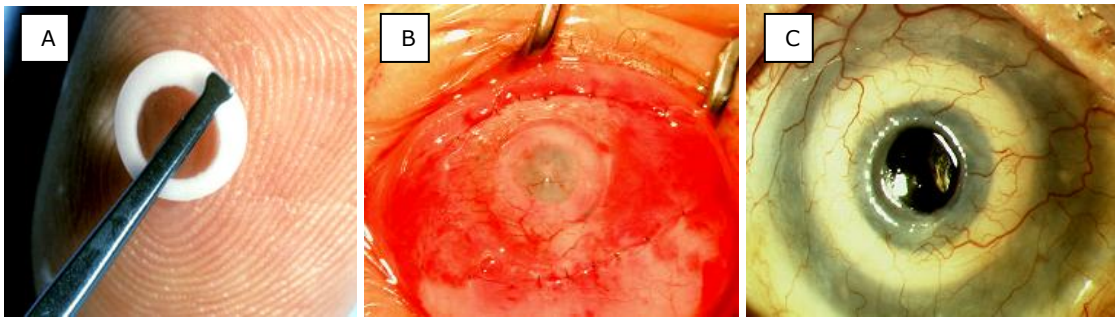


FIGURA 73: A) Queratoprótesis AlphaCor. B) Aspecto del ojo al final de la fase I. C) Aspecto al final de la fase II.

4.2.2.2 QUERATOPRÓTESIS BIOLÓGICAS:

- OSTEOODONTOQUERATOPRÓTESIS (OOKP):

Fue ideada en los años 60 por Strampelli y posteriormente ha sufrido diversas modificaciones (Falcinelli y Lui en los años 90). Se trata de una óptica rígida de PMMA enclavada en un diente y en el hueso alveolar que rodea a éste (FIGURAS 74 y 75) (Falcinelli G et al., 1993) (Liu CSC et al., 1998) (Strampelli B, 1963). En los casos en los que no es posible tomar este tejido existen alternativas como son la utilización de cerámica (Blenke BA et al., 1978) o hueso tibial (FIGURA 76) (Caiazza S et al., 1990) (Stoiber J y Grabner G, 2005) (Temprano JA, 2002). En cualquiera de estas 3 posibilidades la queratoprótesis, una vez elaborada, debe permanecer implantada en el tejido subcutáneo durante un período de 2 a 4 meses, tiempo durante el cual se produce la colonización del componente óseo por fibroblastos. Pasado este tiempo la queratoprótesis se extirpa y se procede a su implante a nivel ocular (Marchi V et al., 1994).

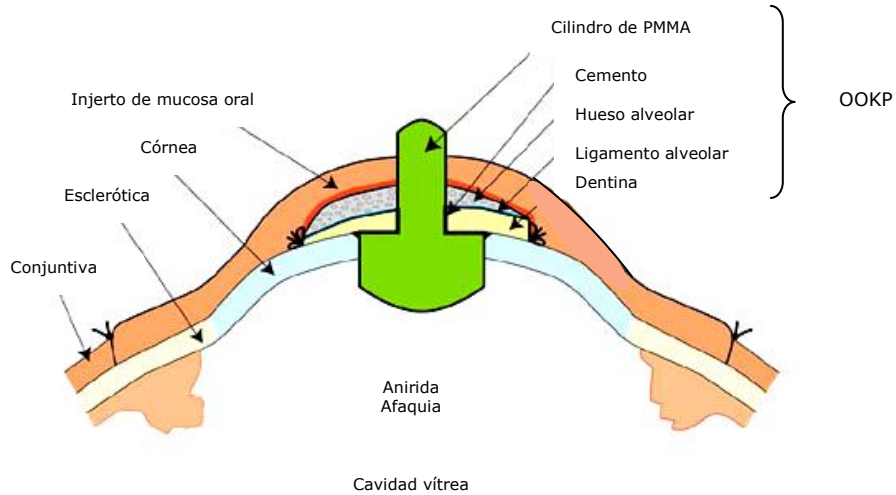


FIGURA 74: Esquema de una OOKP y de la técnica de implante.



FIGURA 75: OOKP preparada para su implante en el tejido celular subcutáneo.

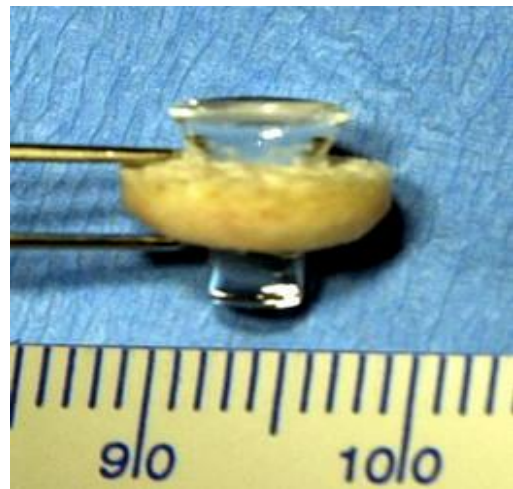


FIGURA 76: Queratoprótesis de Temprano antes de su implante en el tejido celular subcutáneo.

- QUERATOPRÓTESIS DE DOHLMAN-DOANE (BOSTON KPro):

Su desarrollo comenzó en los años 60 y fue aprobada por la FDA en 1992. Se trata de una prótesis no integrada que consta de 2 piezas de PMMA que pellizcan un rodete de córnea donante. Una vez montada la prótesis con el injerto corneal se sutura como si se tratase de una queratoplastia penetrante convencional (FIGURA 77) (Aquavella JV et al., 2005) (Dohlman CH et al., 2006).

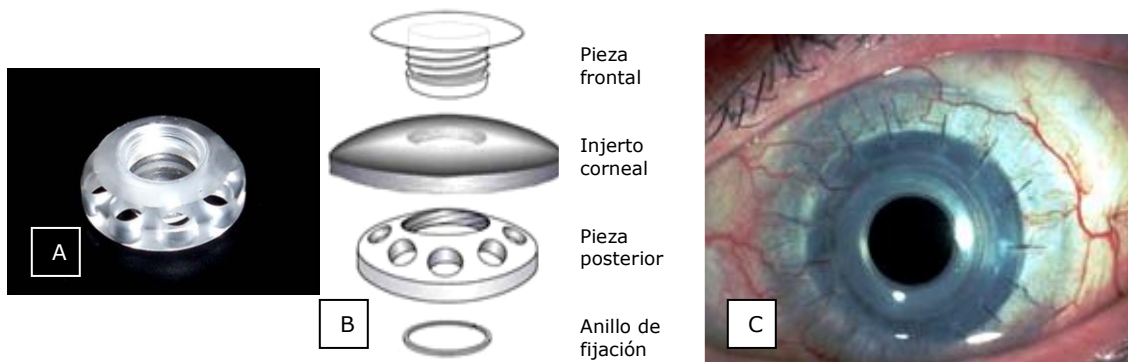


FIGURA 77: A) Aspecto real de una queratoprótesis tipo Boston. B) Esquema de montaje. C) Aspecto del ojo tras el implante de una Boston KPro.

4.2.2.3 CONCLUSIONES SOBRE LAS QUERATOPRÓTESIS:

1) Integración con el receptor:

Los estudios histológicos de las queratoprótesis extruidas han llevado a la conclusión de que la ausencia de extrusiones y la aceptación de la prótesis por parte del receptor dependen de la presencia de queratocitos estromales y de la posibilidad de que éstos migren hacia la prótesis y sean capaces de depositar matriz extracelular en ella (*Sandeman SR et al., 2000*). De los diversos materiales porosos biocompatibles empleados hasta la fecha el que logra una integración más fuerte con el receptor es el Dacron, pero se ve superado por los resultados a largo plazo de las osteodontoqueratoprótesis. Por eso, para facilitar la integración de las queratoprótesis biocompatibles, se recomienda impregnar las mismas con sangre autóloga al implantarlas, así como disminuir en lo posible la utilización de corticoides (*Hille K et al., 2005*) (*Hollick EJ et al., 2006*).

En el caso de las osteoqueratoprótesis se postula que las queratoprótesis con hueso tibial podrían conllevar un mayor número de extrusiones que el observado con las OOKP, ya que la tibia tiene una mayor tasa de recambio que la dentina lo que debe traducirse en una más rápida reabsorción de la lámina ósea. Esta hipótesis será confirmada o descartada dentro de unos

años, cuando tengamos estudios a más largo plazo con queratoprótesis tibiales (*Stoiber J y Grabner G, 2005*).

En general los diversos autores están de acuerdo en que las mayores tasas de éxito se logran con las OOKP, seguidas de las osteoqueratoprótesis tibiales. Las queratoprótesis biológicas vienen a dar unos resultados similares entre ellas, con excepción de los casos de ojo seco extremo y de importante neovascularización de la superficie ocular, donde se muestran superiores (aunque algo inferiores a las queratoprótesis biológicas) las queratoprótesis con camisa de Dacron (ej. Pintucci) puesto que este material es el que ha demostrado una mayor integración con los tejidos receptores (*Falcinelli G et al., 2005*) (*Hille K et al., 2005*) (*Hollick EJ et al., 2006*) (*Marchi V et al., 1994*) (*Stoiber J y Grabner G, 2005*).

2) Óptica de la queratoprótesis:

El material utilizado en la zona óptica debe cumplir una serie de requisitos: a) requisitos ópticos: permitir la transmisión de la luz visible, protegiendo la retina de las radiaciones ultravioleta (debe absorber radiaciones con longitudes de onda por debajo de 300 nm), tener propiedades de tensión similares a la córnea, una adecuada curvatura anterior y posterior y tener un índice de refracción fijo y estable; b) requisitos histológicos: permitir el paso de nutrientes a su través y permitir la colonización de su superficie por células epiteliales de la córnea del receptor. Para ello hasta la fecha se han utilizado diversos materiales como vidrio (*Linnola RJ et al., 1996*), PMMA, polidimetilsiloxano o silicona (*Legeais JM et al., 1994*), los cuales únicamente cumplen los requisitos ópticos. Los últimos intentos en la fabricación de queratoprótesis se centran en la utilización de diversos hidrogeles unidos a un material poroso periférico (ej. queratoprótesis AlphaCor). Éstos últimos, y tras su tratamiento con plasma pueden cumplir ambos tipos de requisitos (*Tsuk A et al., 1997*) (*Latkany R et al., 1997*) (*Sandeman SR et al., 2000*).

3) Resultados:

En general, las queratoprótesis han arrojado resultados desalentadores a largo plazo, por el alto porcentaje de complicaciones (extrusiones, endoftalmitis, glaucoma, formación de membranas pre y retroóptica...), reservándose su uso para casos en los que fracasa la queratoplastia, por lo que los investigadores han continuado la búsqueda de sustitutos corneales verdaderamente biocompatibles con el receptor.

4.2.3 PRÓTESIS CORNEALES BIOLÓGICAS (EQUIVALENTES CORNEALES):

4.2.3.1 INTRODUCCIÓN:

Gracias al gran desarrollo que han experimentado en los últimos años las técnicas de cultivo celular y de Ingeniería Tisular, hoy es posible fabricar distintos tipos de sustitutos tisulares humanos a partir de células madre obtenidas mediante pequeñas biopsias del tejido a reparar (*Atala A, 2000*). De igual modo, los avances en la ingeniería de materiales han posibilitado la utilización terapéutica de matrices basadas en fibras de colágeno, fibrina, quitosán, agarosa o ácido poliglicólico, por ejemplo, posibilitando todos estos materiales el cultivo tridimensional de las células de la córnea.

Diversos laboratorios que trabajan en el diseño de sustitutos corneales mediante Ingeniería Tisular, han establecido tres criterios mayores que deben cumplir todos los constructos corneales (*Chirila TV, 1994*) (*Leibowitz HM et al., 1994*): a) el constructo debe permanecer estable en el ojo receptor durante largos períodos de tiempo, y no debe actuar como un estímulo inflamatorio o inmunológico; b) la óptica central debe ser transparente y formar una imagen de alta calidad sobre la retina; c) el componente estromal debe permitir el crecimiento en su interior de los

queratocitos estromales, la producción y el depósito de matriz extracelular y estar permanentemente fijo. Otros autores han añadido varios criterios adicionales: a) los constructos deben ser anclados mediante la colonización de queratocitos y depósito de proteínas en la interfase para desarrollar suficiente fuerza de tensión, que mantenga el constructo en su sitio. Así mismo, deben tener suficiente fuerza y resistencia para poder ser suturados y evitar así la extrusión; b) el componente periférico debe permitir el paso de nutrientes a su través; c) la superficie anterior debe estar cubierta por epitelio corneal que sea capaz de repararse ante una agresión externa; d) la superficie posterior no debe ser atacada por células o proteínas, esto es, no debe ser susceptible a la degradación enzimática ni al rechazo inmunológico.

4.2.3.2 ESTADO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA:

Utilizando técnicas de Ingeniería Tisular, diferentes investigadores han intentado desarrollar un sustituto eficaz de la córnea que pudiera implantarse sin las desventajas del transplante de córnea heterólogo (*Nishida K et al., 2004*) (*Nishida K, 2003*) (*Reichl S et al., 2004*). Con este objetivo, algunos investigadores han propuesto diferentes técnicas de Ingeniería Tisular para la construcción de equivalentes corneales de origen animal de espesor parcial o completo, como un primer paso en el desarrollo de un sustituto corneal humano (*Alaminos M et al., 2006*) (*Schneider AI et al., 1999*) (*Zieske JD et al., 1994*) (*Minami Y et al., 1993*) e incluso se están aplicando dichos equivalentes para valorar su utilidad en el tratamiento de diversas patologías. Así, se están realizando trasplantes, que no precisan sutura, de epitelio autólogo cultivado en córneas tratadas mediante queratectomía con láser *Excimer* con finalidad refractiva (*PRK*) con la intención de disminuir la incidencia de opacidades tipo Haze, observándose una epitelización inmediata, una disminución de la apoptosis de los queratocitos y una menor formación de colágeno tipo III en la

interfase lo que se asocia a una menor incidencia de Haze. Estos resultados hacen presuponer la utilidad de esta técnica para disminuir la tasa de recidivas en pacientes sometidos a queratectomía fototerapéutica (PTK) por distrofias corneales anteriores o para acelerar la curación y disminuir la incidencia de leucomas en pacientes con defectos epiteliales corneales persistentes (Hayashida Y et al., 2006). Del mismo modo, se están obteniendo buenos resultados en trasplantes de endotelio cultivado que se están llevando a cabo en modelos animales (Koizumi N et al., 2007). E incluso, se ha observado que en equivalentes corneales porcinos compuestos por epitelio y estroma se produce una inervación de los mismos que alcanza el epitelio cuando son implantados mediante queratoplastia lamelar profunda (Legali NS et al., 2007) (Li F et al., 2003) (Liu W et al., 2007).

Sin embargo, aunque algunos científicos han desarrollado sustitutos que imitan parcialmente a la córnea humana (Griffith M et al., 1999), hasta la fecha no se ha conseguido desarrollar un constructo corneal de espesor completo con las características histológicas y funcionales de la córnea humana (Koizumi N et al., 2007). A pesar de que algunos trabajos reflejan que es posible obtener *in vitro* un endotelio humano con características similares a las que tiene *in vivo* (monocapa confluyente de células poligonales unidas por zónulas ocluyentes) (Lai JY et al., 2006), la optimización de las técnicas de cultivo de las células endoteliales corneales humanas continúa siendo uno de los principales escollos que todavía tiene que salvar la Ingeniería Tisular en su búsqueda de un sustituto de la córnea humana de espesor completo.

4.2.3.3 BIOMATERIALES EN LA INGENIERÍA TISULAR DE LA CÓRNEA:

La mayoría de los sustitutos corneales se fabrican a partir de cultivos tridimensionales de las tres estirpes celulares de la córnea, sobre

estromas artificiales fabricados con biomateriales (*Nishida K, 2003*). Un buen biomaterial debería ser biocompatible, transparente y consistente, y las células deberían poder adherirse y crecer sobre él (*Miyashita H et al., 2006*). Los principales materiales utilizados para la construcción de córneas en laboratorio son el colágeno, especialmente el tipo I, y la fibrina, aunque también se emplean con éxito otras sustancias como son los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1%.

A) MATRICES DE COLÁGENO:

El colágeno tipo I se ha utilizado durante mucho tiempo en la fabricación de piel artificial, mucosa oral, córnea y otros tejidos (*Griffith M et al., 1999*) (*Orwin EJ y Hubel A, 2000*) (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*), sin embargo, el colágeno tipo I es un material costoso y tiende a contraerse y a perder volumen cuando se cultivan células en su interior debido a la formación de enlaces no covalentes durante el proceso de gelificación (*Isubuki S et al., 2007*) (*Porter RA et al., 1998*) (*Tegtmeyer S et al., 2001*). Además, los sustitutos corneales fabricados a partir de colágeno son blandos, poco estables presentan una escasa transparencia y tienden a degradarse en poco tiempo (FIGURA 78) (*Chen J et al., 2005*) (*Doillon CJ et al., 2003*) (*Muñoz-Ávila II, 2006*). Todo esto hace que en la actualidad se estén haciendo intentos con colágeno tipo I sometido a diversas técnicas de entrecruzamiento (*cross-linking*) para intentar solventar los problemas que ofrecen las matrices puras de colágeno tipo I. Las sustancias más empleadas en estas técnicas de entrecruzamiento son la N-etil-N'-(3dimetilaminopropil) carbodiamida (EDC) y la N-hidroxisuccinamida (NHS). Los sustitutos estromales así construidos permiten una transmisión de la luz blanca similar a la de la córnea humana y se han implantado mediante queratoplastia lamelar anterior en cerdos, con un seguimiento medio de 1 año. Tras este período, los sustitutos han permanecido transparentes y han sufrido una colonización por parte de las fibras nerviosas de la córnea receptora (NHS) (*Liu W et al., 2007*) (*Liu Y et al., 2006*) (*Vrana NE et al., 2007*). También se ha utilizado, para mejorar las propiedades de los geles

de colágeno tipo I, el entrecruzamiento fotoquímico empleando riboflavina. Las matrices celulares así obtenidas experimentan una menor retracción, a la vez que, la concentración de riboflavina y el tiempo de exposición a la luz empleado, permiten una viabilidad celular mayor del 90% (*Isubuki S et al., 2007*). Por otro lado, se ha comprobado que la adición de diversos glicosaminoglicanos al colágeno tipo I, entre los que destaca el condroitinsulfato, consigue aumentar la transparencia de los geles de colágeno, a la vez que disminuye su retracción. Este último hecho se asocia a una menor expresión de alfa actina de músculo liso (*alpha-smooth muscle actin*), marcador de miofibroblastos (*Orwin EJ et al., 2003*). Además, la estabilización proporcionada por el condroitinsulfato, puede verse reforzada añadiendo un procedimiento de *cross-linking* con glutaraldehído (*Doillon CJ et al, 2003*). Otra sustancia añadida al colágeno tipo I para estabilizarlo es el alcohol polivinílico. Este tipo de matrices de colágeno con alcohol polivinílico permiten una correcta adhesión de las células epiteliales corneales sembradas sobre ellos y el desarrollo de un epitelio estratificado de características similares a las del epitelio corneal cuando el constructo se somete a la técnica aire-líquido (*Miyahsita H et al., 2006*). También, con la finalidad de mejorar la adhesión del epitelio cultivado al sustituto estromal, se han empleado diversos péptidos de adhesión epitelial unidos a dendrímeros. Los dendrímeros (*dendrimers*) son polímeros sintéticos tridimensionales elaborados a partir de un monómero al que se le añaden nuevas ramas mediante un proceso de fabricación a nanoescala. Los péptidos empleados con esta finalidad (p. ej. YIGSR, YIGSRIKVAV, IKVAVYIGSR) se unen a los dendrímeros y estos complejos se emplean como *cross-linkers*, obteniéndose así, sustitutos estromales que favorecen la correcta estratificación de las células epiteliales corneales en ellos sembradas (*Duan X y Sheardown H, 2007*). Frente a la EDC y al glutaraldehído, el entrecruzamiento con dendrímeros proporciona matrices estromales de una mayor transparencia y no posee los efectos tóxicos del glutaraldehído (*Duan X y Sheardown H, 2006*). En esta búsqueda de un sustituto estromal lo más parecido posible al estroma corneal, incluso se

han conseguido fabricar matrices de colágeno tipo I con lamelas alineadas en las que los queratocitos se disponen paralelos a las fibrillas de colágeno sometiendo al colágeno a un campo electromagnético de 7 Teslas y a ciclos sucesivos de gelificación-rotación-gelificación (Torbet J et al., 2007). Frente al colágeno tipo I, el colágeno tipo III parece ofrecer unas mejores propiedades mecánicas y también puede beneficiarse de las técnicas de entrecruzamiento. Tanto el colágeno humano tipo I como el colágeno humano tipo III pueden obtenerse mediante Ingeniería Genética, lo cual evita el riesgo de transmisión de infecciones y de reacciones inmunológicas que supone la utilización de colágeno animal (Liu W et al., 2008).

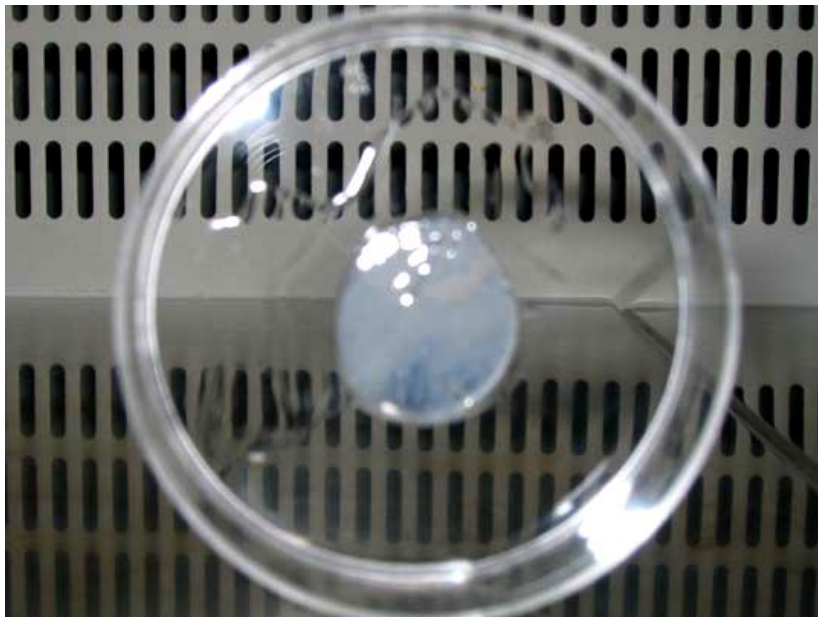


FIGURA 78: Equivalente corneal de espesor completo, construido en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada, sobre un sustituto estromal a base de colágeno tipo I y empleando células corneales de conejo. Puede observarse la escasa transparencia del constructo. (Tomado de Muñoz Ávila JI, 2006).

B) MATRICES DE FIBRINA HUMANA:

Otra sustancia propuesta como sustituto estromal para diferentes constructos tisulares, especialmente para la piel humana, es la fibrina de origen humano (Llames SG et al., 2004) (Meana A et al., 1998). Frente al colágeno, la fibrina ofrece varias ventajas destacando su bajo precio, su

disponibilidad, la buena tolerancia a las células, la ausencia de la contracción de los constructos con ella elaborados y la posibilidad de su obtención autóloga a partir de sangre del propio paciente. Sin embargo, los geles de fibrina poseen ciertas propiedades, como son una escasa consistencia y una transparencia limitada, que limitan su utilización en la fabricación de sustitutos corneales (FIGURA 79).



FIGURA 79: Gel de fibrina humana con queratocitos en su interior preparado para su utilización como sustituto estromal. (Tomado de Muñoz-Ávila JI, 2006).

C) GELES DE AGAROSA Y OTRAS SUSTANCIAS:

La agarosa y otros compuestos, aunque presentan buena transparencia y correcta consistencia para su manipulación, son utilizados con menos frecuencia en Ingeniería Tisular, debido al escaso crecimiento que muestran las células estromales cuando se incluyen en hidrogeles de estos materiales y la deficiente adhesión de las células epiteliales corneales cultivadas sobre ellos (FIGURA 80) (Aufderheide AC y Athanasiou AF, 2005).

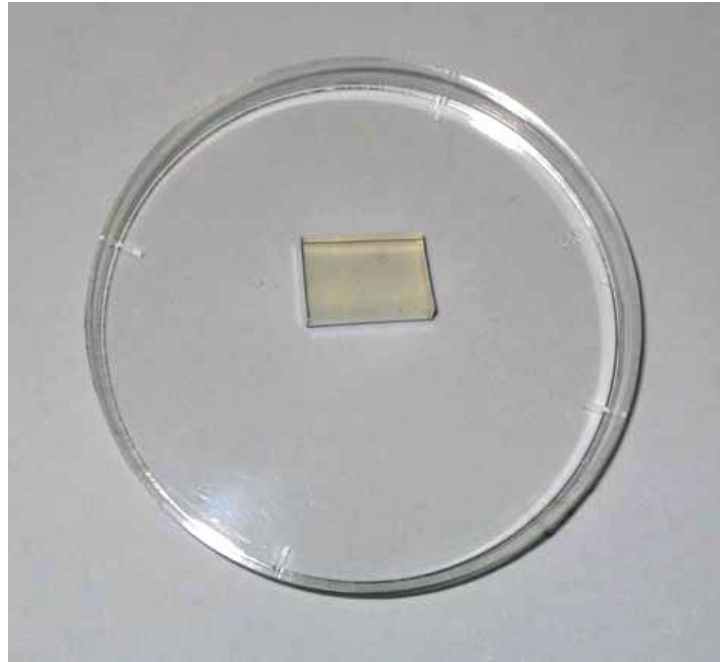


FIGURA 80: Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su interior. Es apreciable la gran transparencia del sustituto estromal. (Tomado de *Muñoz-Ávila JI, 2006*).

D) GELES DE FIBRINA HUMANA Y AGAROSA AL 0,1%:

Como hemos dicho anteriormente, la agarosa, per se, presenta ciertos inconvenientes que hacen de ella una sustancia poco útil para la Ingeniería Tisular de la córnea. Sin embargo, su adición a la fibrina humana en forma de geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% pueden ser una alternativa interesante a la hora de fabricar un sustituto corneal. La agarosa mejora la transparencia y aumenta la consistencia de las matrices de fibrina humana, por lo que los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% se caracterizan por presentar una buena transparencia y una correcta adhesión de las células epiteliales, estromales y endoteliales, permitir ser suturados y no experimentar la retracción observada en las matrices puras de colágeno, además de resultar más económicos (FIGURA 81) (*Alaminos M et al., 2006*).

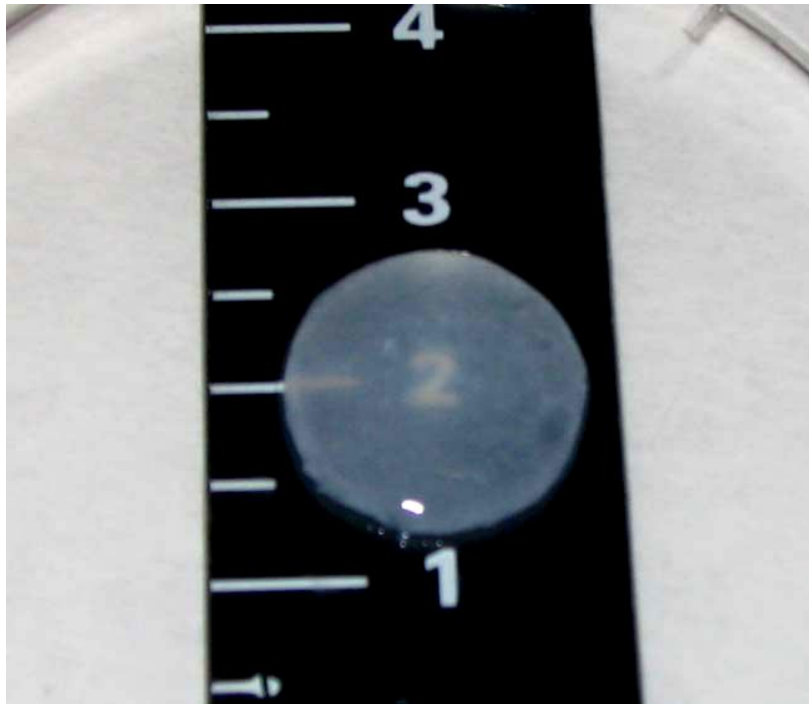


FIGURA 81: Equivalente corneal de espesor completo generado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada fabricado utilizando células epiteliales, estromales y endoteliales de conejo y empleando un gel de fibrina y agarosa al 0,1% como base del sustituto estromal. La transparencia del constructo permite apreciar los números de la guía de referencia. (Tomado de *Muñoz-Ávila JI, 2006*).

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES:

Estudio secuencial del desarrollo y diferenciación del epitelio de córneas humanas generadas en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer y optimizar las condiciones de laboratorio para el cultivo de células epiteliales y estromales de la córnea humana.

2. Desarrollar, en laboratorio, un modelo parcial de córnea humana basado en biomateriales de fibrina humana y agarosa al 0,1% mediante Ingeniería Tisular.

3. Analizar la evolución de las características histológicas del epitelio corneal humano generado en el laboratorio en distintos niveles de desarrollo y maduración.

4. Analizar las características histológicas del estroma corneal humano generado en el laboratorio.

5. Analizar mediante *microarray* la expresión de genes relacionados con la síntesis de uniones intercelulares tipo desmosoma (*macula adherens*) en el epitelio corneal humano generado en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular.

6. Analizar mediante inmunofluorescencia la expresión secuencial de proteínas relacionadas con la síntesis de uniones intercelulares tipo desmosoma (*macula adhaerens*) en el epitelio corneal humano generado en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LIMBOS ESCLERO-CORNEALES HUMANOS LIBRES DE PATOLOGÍA:

Los limbos esclero-corneales humanos, de los que se tomaron tanto las células epiteliales corneales como los queratocitos estromales utilizados en esta Tesis Doctoral proceden de los trasplantes de córnea realizados en los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada. Toda la metodología empleada en esta Tesis Doctoral fue aprobada por la Comisión de Investigación y la Comisión de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y de la Universidad de Granada.

Para los procedimientos de extracción, almacenamiento e implante se siguieron las directrices recogidas en el protocolo para almacenamiento y criopreservación de córneas firmado por los Servicios de Oftalmología y la Coordinación de Trasplantes de dichos hospitales y el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco Sectorial de Tejidos de Granada-Almería, (CRTS-Granada-Almería) (Documento TEJ/PRO/06).

PROCEDIMIENTO:

1. **EXTRACCIÓN:** el procedimiento de extracción de las córneas pudo ser realizado de dos formas, siendo preferible la segunda:
 - Extracción directa de la córnea.
 - Enucleación y posterior tallado de la córnea bajo microscopio en el quirófano de Oftalmología. Para su transporte desde el lugar de la extracción hasta el quirófano de Oftalmología el globo ocular fue suspendido en una cámara húmeda (frasco de urocultivo en cuyo

interior se colocó una gasa estéril empapada en colirio de gentamicina y suero fisiológico 0,9% al 50%).

En ambos casos las córneas fueron extraídas junto con el limbo esclerocorneal, introducidas en el medio de conservación de córneas (Optisol®) indicando si es derecha o izquierda y enviadas al Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería junto con el protocolo de donación correctamente cumplimentado y las muestras sanguíneas (dos tubos de hematimetría y uno de bioquímica).

2. ALMACENAMIENTO:

El almacenamiento de las córneas en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea asegura la custodia de las mismas en condiciones óptimas de conservación.

En el CRTS-Granada-Almería se comprobó toda la documentación recibida, registrándose y realizándose todas las determinaciones analíticas complementarias necesarias. Si la córnea cumplía todos los requisitos pasaba a situación de Distribución a la espera de ser implantada. El tiempo máximo para que la córnea pase a ser apta para distribución es de 48-72 horas (96 horas si se trata de fin de semana) y el tiempo total óptimo desde la extracción hasta el implante es de 8 días (aunque el medio de conservación actualmente utilizado permite su almacenamiento hasta 14 días).

3. IMPLANTE:

En cada trasplante se siguió el mismo procedimiento. Una vez recibido en el CRTS el Informe de Solicitud de Tejido (TEJ/F/03) firmado por el oftalmólogo y la Autorización de Receptor (TEJ/F/09) firmada por el paciente, la córnea fue enviada en Optisol® dentro de un embalaje isotérmico al quirófano de Oftalmología. En el quirófano se extrajeron dos muestras de sangre del receptor, se cumplimentó el Certificado de Implante (TEJ/F/08) y se procedió al tallado con

trépano de la córnea para obtener el botón corneal que iba a ser trasplantado al paciente, introduciéndose el resto de la córnea (córnea periférica y limbo esclero-corneal) de nuevo en el frasco de Optisol[®], enviándose éste a la mayor brevedad al Departamento de Histología para su posterior procesamiento. Las muestras de sangre y el Certificado de Implante se enviaron al CRTS y se tomó una muestra del líquido de conservación que fue enviada a Microbiología.

2. DESARROLLO DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS A PARTIR DE CÉLULAS PROCEDENTES DE LIMBOS ESCLERO-CORNEALES HUMANOS LIBRES DE PATOLOGÍA:

Transcurrido el período de transporte, los rodetes corneales fueron lavados dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1.25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a los mismos.

Para obtener las células epiteliales y queratocitos estromales a partir de los limbos esclero-corneales humanos utilizamos una técnica de aislamiento secuencial según se describe a continuación. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

2.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES:

En primer lugar, los rodetes corneales humanos se tallaron quirúrgicamente para separar el limbo esclero-corneal de la periferia corneal. A continuación, los limbos esclero-corneales se sometieron a una digestión enzimática en una solución de tripsina 0,5 g/l (Gibco BRL Life

Technologies, Karlsruhe, Alemania) durante 10 minutos a 37°C. Tras este procedimiento de digestión, la capa de endotelio corneal se separó mecánicamente mediante disección de la membrana de Descemet bajo magnificación microquirúrgica. Una vez desprovistos de endotelio y membrana de Descemet, los limbos esclero-corneales individualizados se examinaron bajo visión microscópica, eliminándose cualquier resto de conjuntiva, esclerótica, iris u otros tejidos que pudiesen contaminar o impedir el crecimiento de las células epiteliales corneales.

Para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales, los limbos esclero-corneales fueron divididos en pequeños segmentos de alrededor de 2 X 2 mm y unas 100 µm de espesor mediante fragmentación mecánica de los mismos en condiciones de esterilidad. Para favorecer la adhesión de los explantes límbicos a las superficies de cultivo, dichos explantes se depositaron boca abajo (con el epitelio en contacto directo con la superficie) en frascos de cultivo estériles de 25 cm² de superficie desprovistos de medio de cultivo. Quince minutos más tarde, cuando los explantes se hubieron adherido a las superficies de cultivo, se procedió a añadir el medio de cultivo específico para células epiteliales.

Para evitar el crecimiento no deseado de queratocitos y fibroblastos, cuya tasa de proliferación es habitualmente muy superior a la de las células epiteliales de la córnea, los explantes de limbo esclero-corneal se sembraron y cultivaron bajo condiciones selectivas que favorecían el crecimiento de las células epiteliales e inhibían la adhesión y la proliferación de las células estromales procedentes de la propia muestra. Para ello, se empleó un medio de cultivo selectivo para células epiteliales (MP), el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales corneales sobre los fibroblastos y los queratocitos. La composición del medio MP se detalla a continuación:

1. Tres partes de medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Tabla I) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinheim, Alemania) y una parte de medio Ham F-12 (Sigma-Aldrich ref. N6658, Steinheim, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final de 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinheim, Alemania).
3. Adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich ref. A9795, Steinheim, Alemania).
4. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B).
5. Factores de crecimiento para células epiteliales en cultivo:
 - Insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich ref. I2767, Steinheim, Alemania).
 - Triiodotironina (1,3 ng/ml) (Sigma-Aldrich ref. T5516, Steinheim, Alemania).
 - Toxina colérica (8 ng/ml) (Sigma-Aldrich ref. C3012, Steinheim, Alemania).
 - Hidrocortisona (0,4 µg/ml) (Sigma-Aldrich ref. H0888, Steinheim, Alemania).
 - Factor de crecimiento epidérmico EGF (10 ng/ml) (Becton-Dickinson ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU).

COMPONENTE	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Medio de cultivo de Ham F12
SALES INORGÁNICAS		
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.265	0.0441
CuSO ₄ •5H ₂ O	—	0.0000025
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.0001	—
FeSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000834
KCl	0.4	0.224
MgCl•6H ₂ O	—	0.123
MgSO ₄	0.09767	—
Na ₂ HPO ₄	—	0.14204
NaCl	6.4	7.599
NaH ₂ PO ₄	0.109	—
NaHCO ₃	3.7	1.176
ZnSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000863
AMINOÁCIDOS		
Glicina	0.03	0.00751
L-Alanina	—	0.009
L-Arginina•HCl	0.084	0.211
L-Asparagina•H ₂ O	—	0.01501
L- Ácido Aspártico	—	0.0133
L-Cisteína•2HCl	0.0626	0.035
L- Ácido Glutámico	—	0.0147
L-Glutamina	0.584	0.146
L-Histidina•HCl•H ₂ O	0.042	0.02096
L-Isoleucina	0.105	0.00394
L-Leucina	0.105	0.0131
L-Lisina•HCl	0.146	0.0365
L-Metionina	0.03	0.00448
L-Fenilalanina	0.066	0.00496
L-Prolina	—	0.0345
L-Serina	0.042	0.0105
L-Treonina	0.095	0.0119
L-Triptófano	0.016	0.00204
L-Tirosina•2Na•2H ₂ O	0.10379	0.00778
L-Valina	0.094	0.0117
VITAMINAS		
Colina	0.004	—
D- Ácido Pantoténico •½Ca	0.004	0.00048
Ácido Fólico	0.004	0.00132
Hipoxantina	—	0.00408
Ácido Linoleico	—	0.0000084
mio-Inositol	0.0072	0.018
Ácido nicotínico	0.004	0.000037
Piridoxina•HCl	0.004	0.000062
Riboflavina	0.0004	0.000038
Tiamina•HCl	0.004	0.00034
Ácido Tióctico	—	0.00021
Timidina	—	0.00073
Vitamina B-12	—	0.00136
OTROS		
D-Glucosa	4.5	1.802
Fenol rojo•Na	0.0159	0.0013
Ácido pirúvico	—	0.11
Putrescina•HCl	—	0.000161

TABLA I: Composición química de los medios de cultivo DMEM y Ham F12. Valores expresados en gramo por litro de medio de cultivo.

2.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE QUERATOCITOS ESTROMALES:

El aislamiento de queratocitos corneales humanos se llevó a cabo a partir de los fragmentos de córnea humana que iban incluidos en los rodetes corneales y que se extirparon de éstos en la fase inicial del procesamiento de los mismos. En primer lugar, se extirpó mecánicamente la membrana de Descemet y el endotelio corneal. A continuación, se eliminó la mayor parte de las células epiteliales mediante raspado con un escarificador. Finalmente, el estroma corneal remanente se dividió en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm de longitud, los cuales se incubaron en una solución de colagenasa I de *Clostridium histolyticum* al 2% para digerir la matriz extracelular y liberar así los queratocitos estromales. Los queratocitos corneales humanos así obtenidos se recogieron mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie en presencia de medio de cultivo para queratocitos (MQ). El medio MQ, desprovisto de factores de crecimiento, estaba compuesto por:

1. Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Tabla I) con L- glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinheim, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinheim, Alemania).
3. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una

concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B).

3. SUBCULTIVOS DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE LOS CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DE LA CÓRNEA:

Una vez alcanzada la confluencia, los distintos cultivos celulares se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma Aldrich ref. T4799, Steinheim, Alemania) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1 ml de medio de cultivo MP o MQ. La presencia de abundantes proteínas séricas en los medios de cultivo MP y MQ es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio MP o MQ y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de células epiteliales se expandieron hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo, mientras que los queratocitos estromales se expandieron hasta unas quince veces antes de su uso para fabricar los sustitutos de corneales.

En todos los casos, y para asegurar una adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos corneales humanos se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los primeros subcultivos.

4. CONGELACIÓN DE CÉLULAS:

Para su conservación a largo plazo, los cultivos confluentes de células se procesaron y congelaron a temperatura de nitrógeno líquido. Para ello, las células epiteliales y estromales y de los subcultivos procedentes de los cultivos primarios se trataron con una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma Aldrich ref. T4799, Steinheim, Alemania) a 37°C durante 10 minutos para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo. Para neutralizar la tripsina, se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo MP o MQ (todos ellos contienen un 10% de suero bovino fetal), obteniéndose las células separadas mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras esto, las células se mantuvieron sobre hielo y se resuspendieron en medio de congelación celular (10% de DMSO, 10% de suero bovino fetal y 80% de DMEM) en viales especiales para ultracongelación. Para evitar un choque térmico demasiado brusco, las células incluidas en el medio de congelación se congelaron a -20°C durante las primeras 12-24 horas, pasándose a continuación a una temperatura de -80°C durante 24 horas y, finalmente, a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron a largo plazo.

5. ELABORACIÓN DE UN SUSTITUTO DEL ESTROMA CORNEAL: FABRICACIÓN DE UN GEL DE FIBRINA HUMANA Y AGAROSA AL 0,1%:

Para la generación de geles de fibrina humana y agarosa al 0,1%, se utilizó plasma sanguíneo humano congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT). La fabricación de dichos sustitutos estromales de fibrina humana y agarosa con queratocitos corneales humanos se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (*Llames SG et al., 2004*) (*Meana A et al., 1998*). Para ello, se utilizaron alrededor de 50.000 queratocitos procedentes de los cultivos primarios, a los cuales se añadieron unos 5 ml de plasma sanguíneo humano (equivalente a 10-12 mg de fibrinógeno). Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina humana y agarosa, se añadieron 200 μ l de ácido tranexámico (Amchafibrín[®], Fides Ecofarma, Valencia, España). La reacción de polimerización de la fibrina se precipitó mediante la adición de 1 ml de Cl_2Ca 0,025 mM a la mezcla y se le añadió una pequeña cantidad de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich ref. A9045, Steinheim, Alemania) disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. La concentración final de agarosa en el gel fue del 0,1% (p/v). Una vez mezclados todos los componentes, y evitando un trauma físico excesivo, estos geles se alicuotaron cuidadosamente en las superficies de cultivo.

Los geles alicuotados se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂, durante 2 horas para que coagularan. Después de este tiempo se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo MQ.

6. CONSTRUCCIÓN DE UN EQUIVALENTE DE CÓRNEA HUMANA COMPUESTO POR EPITELIO Y ESTROMA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR:

La construcción de equivalentes corneales organotípicos se llevó a cabo en sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4 μm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU) de modo secuencial. Para ello, en primer lugar, se elaboró un sustituto estromal directamente sobre las superficies de cultivo y, posteriormente, en un segundo tiempo, se fabricó un equivalente epitelial corneal en la superficie del mismo.

Los sistemas de cultivo Transwell® sobre los que se construyeron los equivalentes corneales humanos están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato (FIGURA 82). El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro.



FIGURA 82: Sistema de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4 μm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU).

Para la construcción de los equivalentes corneales artificiales de espesor parcial mediante Ingeniería Tisular, en primer lugar se procedió a fabricar un sustituto estromal sobre la membrana porosa de los insertos Transwell®. Para ello, se empleó como sustituto estromal una matriz de fibrina humana y agarosa al 0,1% con queratocitos embebidos en su interior, según se describió en el apartado anterior. Seguidamente, una vez solidificados los sustitutos estromales 24 horas más tarde, se tripsinizaron los cultivos primarios de epitelio corneal, cultivándose las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales en medio MP (unas 500.000 células en cada caso). Finalmente, 15 días después de establecer el cultivo epitelial sobre el sustituto estromal, se utilizó en algunos casos la técnica de cultivo denominada *interfase aire-líquido* para favorecer la diferenciación y estratificación epitelial (Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003). Para ello, se añadió medio de cultivo MP al depósito inferior del sistema, pero no al superior, que se expuso directamente al aire. Esta técnica aire-líquido se mantuvo durante 15 días más (FIGURA83).

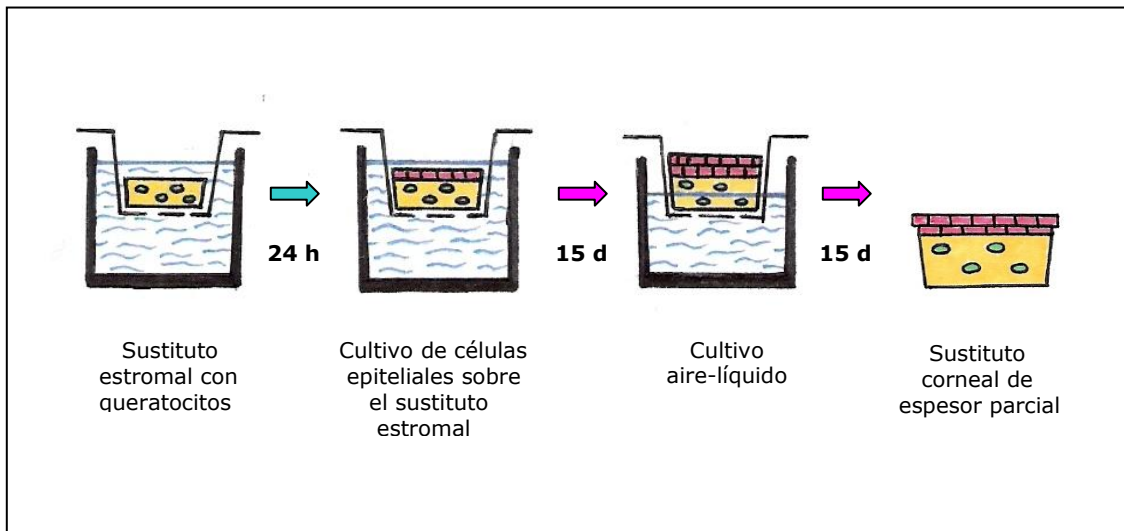


FIGURA 83: Esquema de la fabricación de sustitutos corneales empleando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo porosos Transwell®.

7. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES:

En esta Tesis Doctoral hemos analizado diferentes tipos de sustitutos de la córnea humana de espesor parcial generados en laboratorio mediante Ingeniería Tisular, en concreto, se analizaron sustitutos corneales compuestos por estroma y epitelio en distintos grados de maduración y desarrollo, tal y como se muestra a continuación:

1. Córneas inmaduras con una capa de células epiteliales.
2. Córneas inmaduras con 2-3 capas de células epiteliales.
3. Córneas inmaduras con 6-7 capas de células epiteliales.
4. Córneas maduras tras cultivo aire-líquido.

Como control normal se utilizaron córneas humanas nativas procedentes de donantes sanos.

7.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA:

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, los diferentes sustitutos corneales y las córneas humanas nativas se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4

µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

7.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN:

7.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO:

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2) a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), desecándose por completo mediante el método del punto crítico (Fernández-Segura, 1999). Este método consiste en la sustitución de la acetona tisular, junto con cualquier resto de agua que pudiese quedar en las muestras, por CO₂ líquido en frío. A continuación, el CO₂ es evaporado a baja presión, aumentándose progresivamente la temperatura, hasta que la muestra queda desecada por completo. Una vez desecados, los tejidos fueron recubiertos por átomos de oro y analizados en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

7.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN:

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 horas a 4°C,

utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la polimerización de la resina durante 2 horas a 60°C.

Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichter Ultracut. El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 10 min y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (1963). La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania) (FIGURA 84).



FIGURA 84: Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizado en esta Tesis Doctoral.

8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE *MICROARRAY*:

Para el análisis de expresión génica se extrajo el ARN total de los cultivos corneales primarios de células epiteliales y queratocitos estromales humanos y del epitelio de los equivalentes corneales humanos maduros utilizando el sistema comercial Qiagen RNeasy System[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Una vez extraído el ARN se comprobó su integridad y su calidad mediante visualización directa del ARN ribosómico de 28 y 18S en ARN total separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio, así como mediante el sistema de análisis Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EEUU).

Para el análisis, todos los ARN fueron transformados en ADNc mediante una transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, California, EEUU) con un oligonucleótido rico en colas de timina (T7-polyT primer), el cual permitió la amplificación de cualquier ARN mensajero presente en la célula.

A continuación, se sintetizaron los ARNc correspondientes a todos los ADNc mediante transcripción *in vitro*, utilizando para ello UTP y CTP marcados con biotina (Enzo Diagnostics, Farmingdale, Nueva York, EEUU). Una vez sintetizados, y para favorecer la hibridación, estos ARNc se fragmentaron químicamente añadiendo una concentración elevada de sales y altas temperaturas.

Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los chips que constituyen el sistema de *microarray* Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0[®] de la casa comercial Affymetrix durante 16 horas a 45°C. Tras un proceso totalmente estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados en una escala arbitraria. Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el programa informático Affymetrix Microarray Suite 5.0[®] suministrado por la casa comercial Affymetrix.

9. INMUNOFLUORESCENCIA:

Para evaluar la expresión de proteínas específicas en los controles y en los constructos de córnea generados en el laboratorio, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia sobre dichos tejidos, tal como se describe a continuación:

En primer lugar, para llevar a cabo la inmunofluorescencia, se utilizaron secciones de 4 μm de espesor de los diferentes tejidos corneales incluidos en parafina. Una vez obtenidas las secciones de tejido, se procedió a eliminar la parafina de los portaobjetos mediante inmersión en xileno durante 10 minutos (3 veces), sustituyéndose a continuación el xileno por concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 80 y 70% de etanol) y, finalmente, por agua destilada para rehidratar las muestras.

Posteriormente, las muestras se incubaron en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% durante 10 minutos para eliminación de las peroxidasas endógenas que pudiesen existir en el tejido, lavándose en agua a continuación. Una vez extinguida la actividad peroxidasa de los tejidos, se procedió a exponer los epítomos de las proteínas presentes en la muestra mediante incubación en tampón citrato 0,01 M (pH 6,0) (Vitro, S.A. ref. MAD-004071R-5, España) a 98°C durante 3 minutos, lavándose los portaobjetos a continuación con abundante agua destilada. Después de enfriar las muestras, éstas se incubaron durante 15 minutos en una solución de prehibridación compuesta por albúmina sérica bovina al 2% (Sigma-Aldrich ref. A4919, Steinheim, Alemania) y suero normal de caballo al 1% (Vector Laboratories ref. S-2000, Burlingame, California, EEUU) en PBS con un 0,5% de tritón X-100 (Sigma-Aldrich ref. 234729, Steinheim, Alemania). La solución de prehibridación juega un importante papel a la

hora de evitar la hibridación del anticuerpo primario a los componentes inespecíficos de la muestra.

Para la identificación de células con expresión específica de las proteínas de interés, se utilizaron los anticuerpos primarios que se detallan en la Tabla II. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de prehibridación (diluciones en Tabla II). La incubación frente a los anticuerpos primarios se llevó a cabo en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón marcados con FITC o anti-conejo marcados con CY3 a dilución 1:100 durante 30 minutos (Tabla II). Tras varios lavados, los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI y las muestras se cubrieron con cubreobjetos de vidrio. Para el análisis de los tejidos así procesados, se utilizó un microscopio confocal Leica DMI6000.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	ORIGEN	DILUCIÓN
Placoglobina	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Ratón	1:25
Desmogleína 3	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Ratón	1:25
Desmoplaquina	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo	1:75
Ac. secundario anti-ratón	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo	1:100
Ac. secundario anti-conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Oveja	1:100

TABLA II: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta Tesis Doctoral.

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CORNEALES HUMANAS:

1.1 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS:

Las células de epitelio corneal humano fueron obtenidas a partir de limbos esclerocorneales humanos procedentes de trasplantes de córnea realizados en los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada, las cuales se cultivaron usando medios y técnicas de cultivo estándar (medio MP con diversos factores de crecimiento). Los limbos esclero-corneales se dividieron en fragmentos de alrededor de 2 X 2 mm, los cuales se cultivaron directamente sobre frascos de cultivo en ausencia de células de soporte 3T3.

Utilizando los los métodos y técnicas descritos en el apartado "Materiales y Métodos" de esta Tesis Doctoral, las células de epitelio corneal tendieron a migrar desde los fragmentos de los limbos esclero-corneales procesados alrededor del 5º día de cultivo ($5,67 \pm 3,06$ días) (FIGURA 85), alcanzando la confluencia y formando una monocapa de células después de unos 22 días de cultivo ($22,33 \pm 5,13$ días) (FIGURAS 86 y 87). Una vez cultivadas, las células de epitelio corneal mostraron una morfología típica, redondeada, poliédrica o con forma de adoquín.

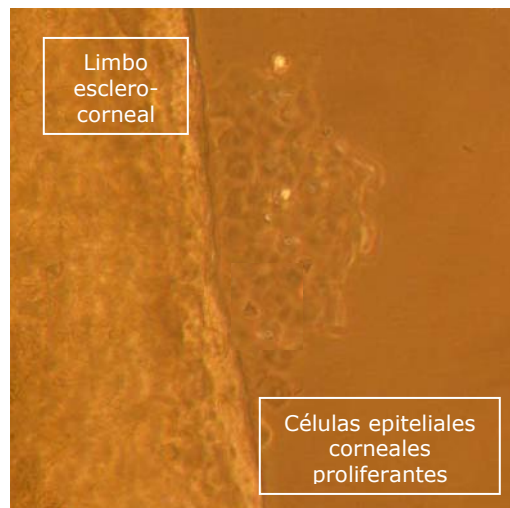


FIGURA 85: Cultivo de células epiteliales corneales humanas a partir de un fragmento de limbo esclero-corneal. Imagen obtenida mediante microscopía de contraste de fases a los 5 días de cultivo en ausencia de células alimentadoras 3T3. Puede verse cómo comienzan a migrar y proliferar las células epiteliales desde el segmento límbico.

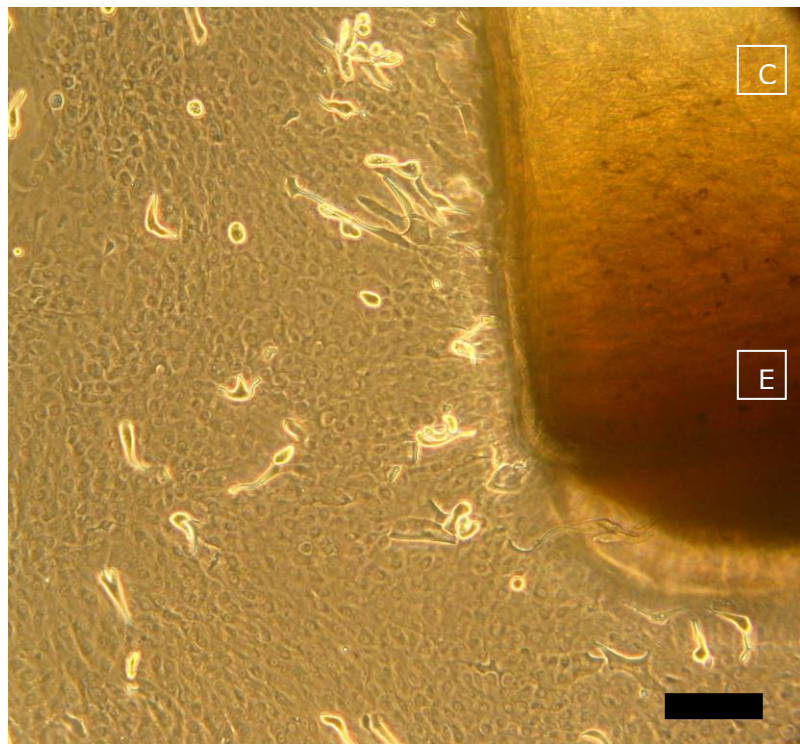


FIGURA 86: Microscopía óptica de contraste de fases: Cultivo de células epiteliales humanas a partir de un fragmento de limbo esclero-corneal en ausencia de células alimentadoras 3T3. Imagen obtenida a los 23 días de cultivo (cultivo confluyente). Puede observarse la transición entre córnea (C) y esclerótica (E) a nivel del fragmento de limbo. La barra de escala indica 100 μm .

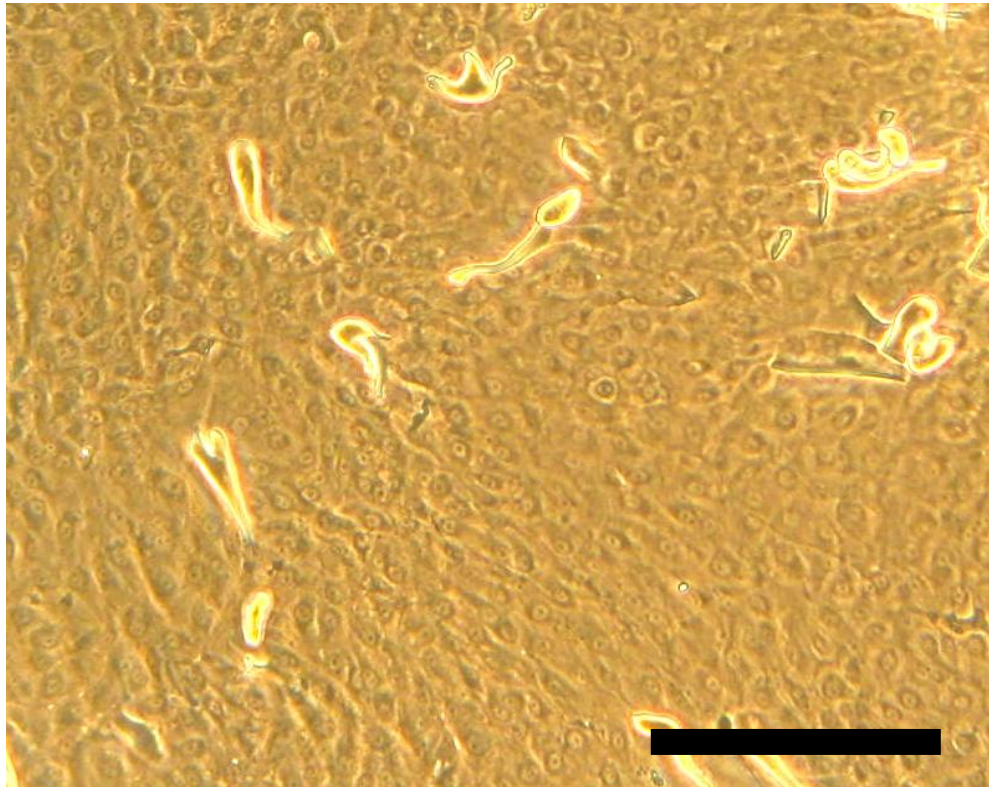


FIGURA 87: Aspecto a mayor aumento de un cultivo confluyente de células epiteliales humanas cultivadas en ausencia de células alimentadoras 3T3. Las células presentan una morfología típica redondeada, poliédrica o en adoquín. La barra de escala indica 200 μm .

CULTIVO DE QUERATOCITOS ESTROMALES HUMANOS:

Los queratocitos estromales se obtuvieron a partir del estroma corneal periférico que iba incluido en los rodetes corneales humanos procedentes de las queratoplastias penetrantes llevadas a cabo en los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada. El tejido estromal se fraccionó en explantes de 1 mm de longitud, que se cultivaron en medios de cultivo celular exentos de factores de crecimiento (medio MQ) y empleando técnicas de cultivo celular estándar.

En cultivo, las células estromales obtenidas a partir de córneas humanas mostraron una morfología alargada, fusiforme o estrellada, ofreciendo un buen nivel de crecimiento (FIGURA 88). Los queratocitos migraron desde los explantes en poco tiempo, alcanzando la confluencia alrededor del 13º día de cultivo ($13,33 \pm 1,53$ días). En cultivo, los queratocitos estromales presentan una tasa de proliferación superior a la de las células del epitelio corneal, razón por la cual cuando ambos tipos celulares coexistieron en el mismo cultivo los queratocitos acabaron por desplazar a las células epiteliales.

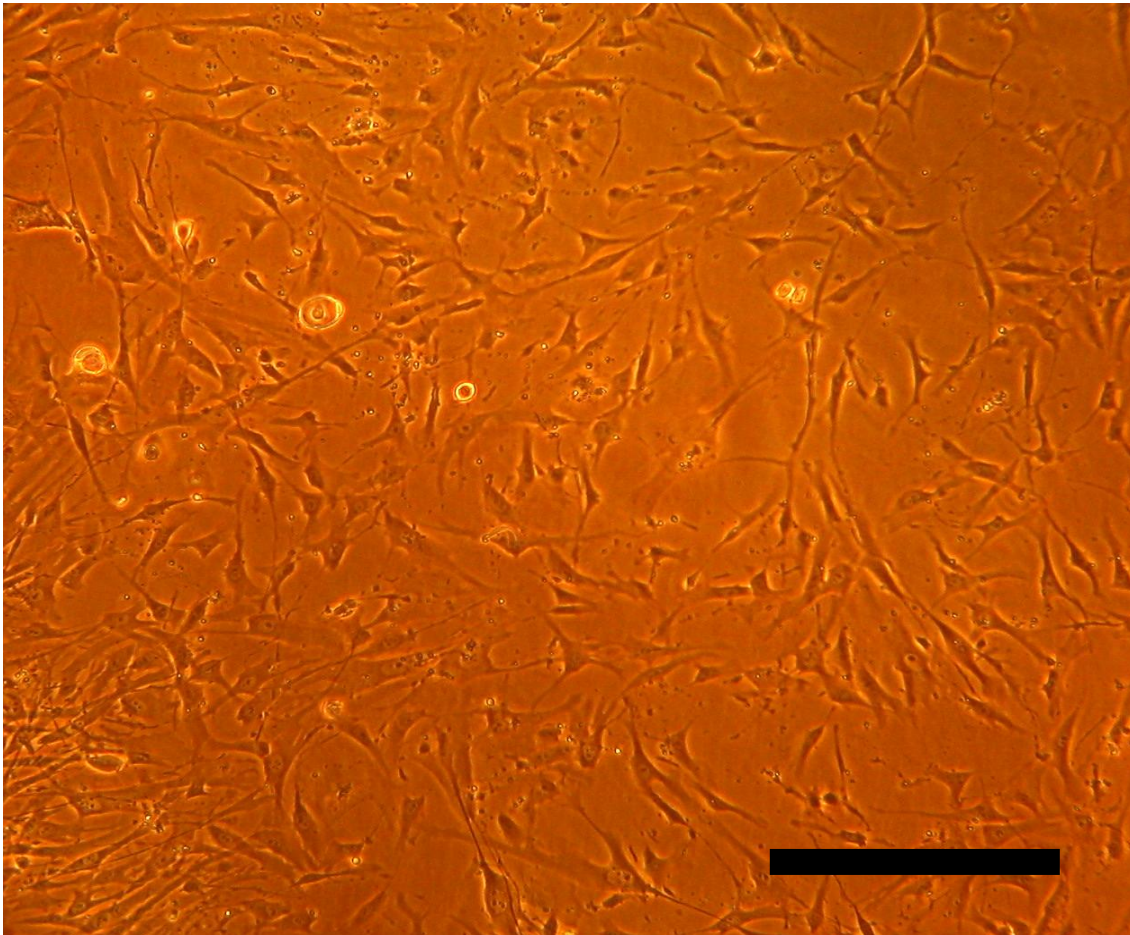


FIGURA 88: Cultivo subconfluyente de queratocitos corneales humanos. Imagen obtenida mediante microscopio de contraste de fases tras 7 días de cultivo. La barra de escala indica 200 μm .

2. GENERACIÓN DE SUSTITUTOS CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR:

En esta Tesis Doctoral, hemos conseguido elaborar sustitutos de la córnea humana de espesor parcial, compuestos por estroma y epitelio, mediante Ingeniería Tisular. Para ello, hemos utilizado un sistema basado en el empleo de soportes porosos que permiten, de forma efectiva, el paso de los nutrientes y factores de crecimiento desde el medio de cultivo hacia los espacios superiores. En primer lugar, fabricamos un sustituto estromal en los compartimientos superiores de los insertos porosos. Como sustituto del estroma corneal elaboramos un gel de fibrina humana al que se añadió agarosa hasta alcanzar una concentración final del 0,1%. Una vez solidificados, estos geles presentaron una transparencia adecuada y una consistencia que permitió una correcta manipulación de los mismos. Los queratocitos incluidos en los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% mostraron una morfología alargada o estrellada y se encontraban distribuidos de forma homogénea en el sustituto estromal. En ninguno de los casos se observó retracción ni pérdida de volumen de los equivalentes estromales así generados. En segundo lugar, se desarrolló eficazmente un epitelio corneal humano en la superficie de los constructos mediante subcultivo de células epiteliales corneales a este nivel.

3.EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE EQUIVALENTES CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL:

La evaluación microscópica de los equivalentes corneales humanos de espesor parcial generados mediante Ingeniería Tisular se llevó a cabo mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión. Tanto el componente epitelial como el componente estromal de los constructos se analizó mediante estas técnicas. Los equivalentes se evaluaron en distinto grado de maduración y desarrollo, utilizándose como control córneas humanas nativas.

3.1 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL COMPONENTE EPITELIAL:

A) MICROSCOPÍA ÓPTICA:

Una vez sembradas las células epiteliales sobre los sustitutos estromales, los constructos se mantuvieron sumergidos en medio de cultivo MP durante 15 días. Durante este tiempo, se formó una monocapa de células epiteliales sobre los sustitutos estromales que, progresivamente y a lo largo de las dos semanas siguientes, dio paso a la formación equivalentes epiteliales estratificados compuestos por 2-3 capas celulares inicialmente y 6-7 capas celulares más adelante. Pasados estos 15 días, los constructos se sometieron a cultivo aire-líquido durante otros 15 días. Transcurrido este tiempo, el estudio de los equivalentes corneales mostró la existencia de un epitelio plano estratificado de características muy similares a las del epitelio humano nativo (FIGURA 89).

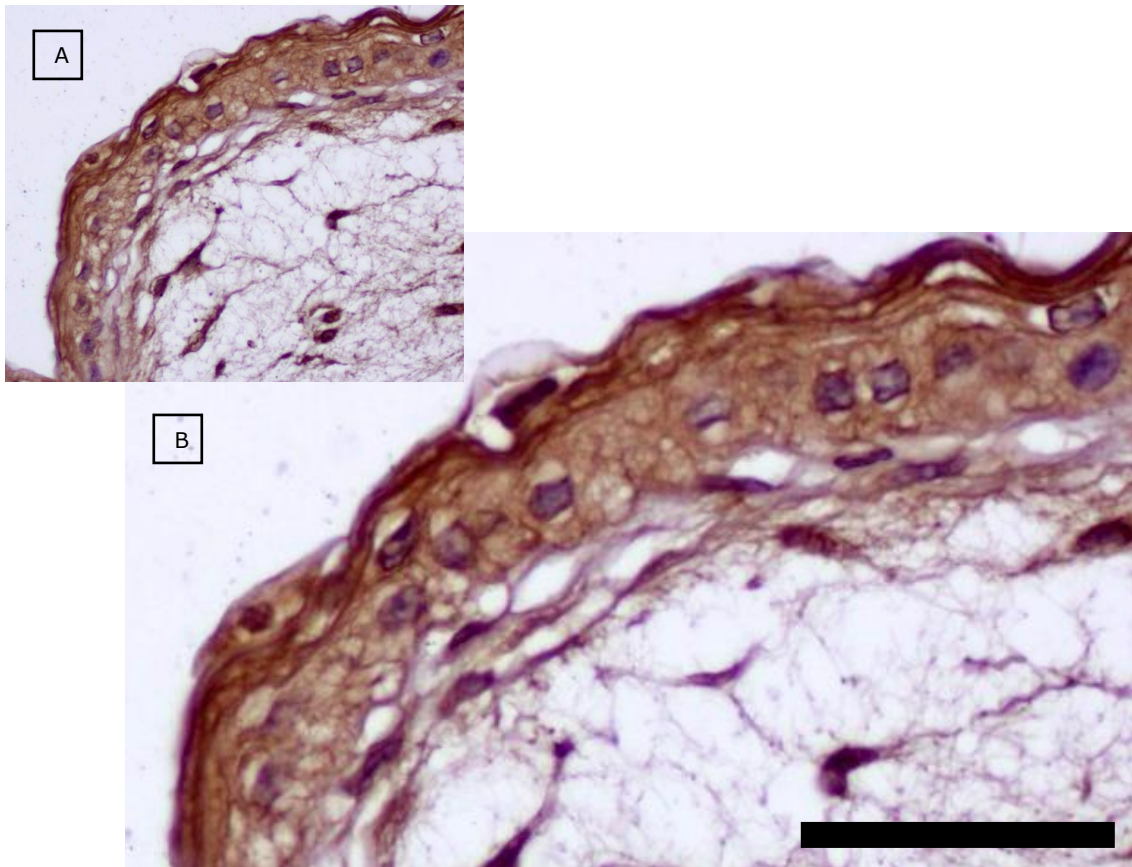


FIGURA 89: A) Equivalente corneal humano compuesto de estroma y epitelio tras cultivo aire-líquido observado mediante microscopía óptica. B) Detalle, a mayor aumento, del componente epitelial del constructo. La barra de escala indica 100 μm .

B) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO:

La evaluación mediante microscopía electrónica de barrido demostró la presencia de una barrera epitelial en la superficie de los constructos desde las fases iniciales, la cual estaba compuesta por un epitelio confluyente que se extendía a lo largo de toda la superficie del constructo. Del mismo modo, las células epiteliales superficiales mostraron una morfología aplanada, con abundantes microvellosidades en su superficie y siendo visible un fenómeno de descamación celular similar al observado en la córnea humana nativa (FIGURA 90).

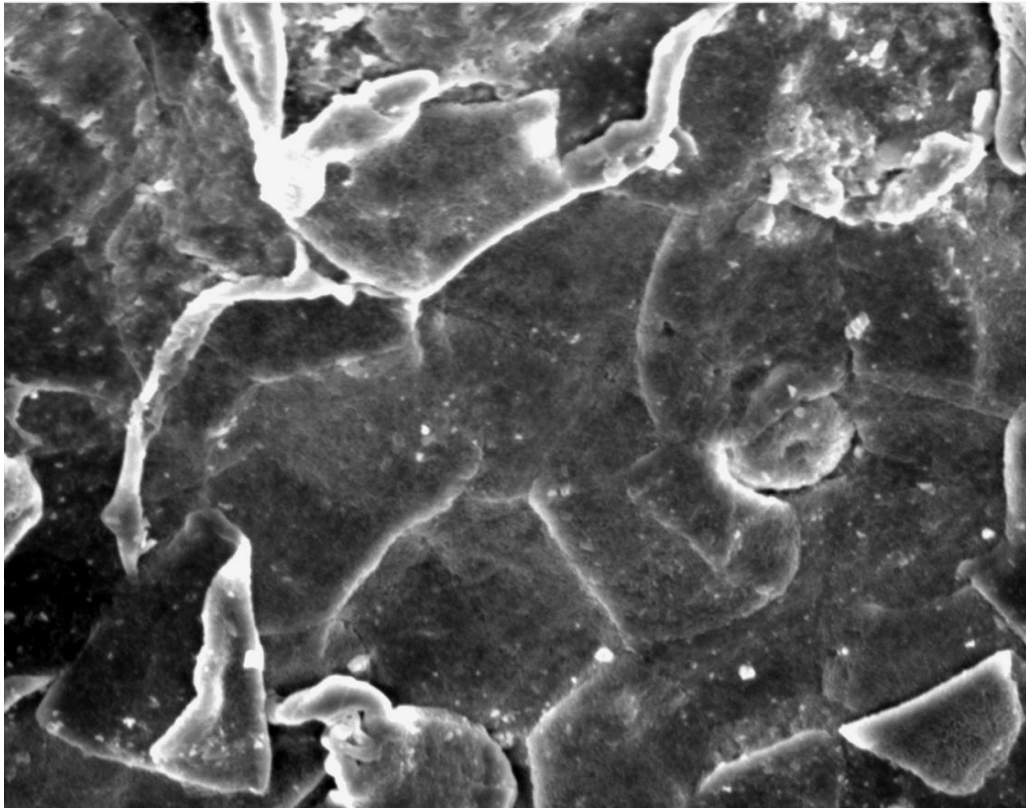


FIGURA 90: Epitelio de los constructos corneales humanos analizado mediante microscopía electrónica de barrido. Son visibles algunas células en fase de descamación en la superficie epitelio.

C) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN:

El análisis ultraestructural de los sustitutos corneales mediante microscopía electrónica de transmisión en distintos momentos de su desarrollo puso de manifiesto la progresiva aparición y maduración de numerosas uniones intercelulares entre las células epiteliales de los constructos corneales (FIGURA 91). Los constructos corneales inmaduros con una capa de células epiteliales no mostraron uniones intercelulares. La presencia de uniones intercelulares inmaduras se detectó en el momento en que el epitelio corneal de los equivalentes comenzó a estratificarse. Finalmente, los sustitutos maduros, tras 15 días de cultivo aire-líquido, presentaron numerosas y bien desarrolladas uniones intercelulares. Dentro de estas uniones las más abundantes fueron los desmosomas, lo que

sugiere el epitelio corneal generado mediante Ingeniería Tisular en estas condiciones puede constituir una barrera frente a las agresiones externas similar a la del epitelio corneal nativo.

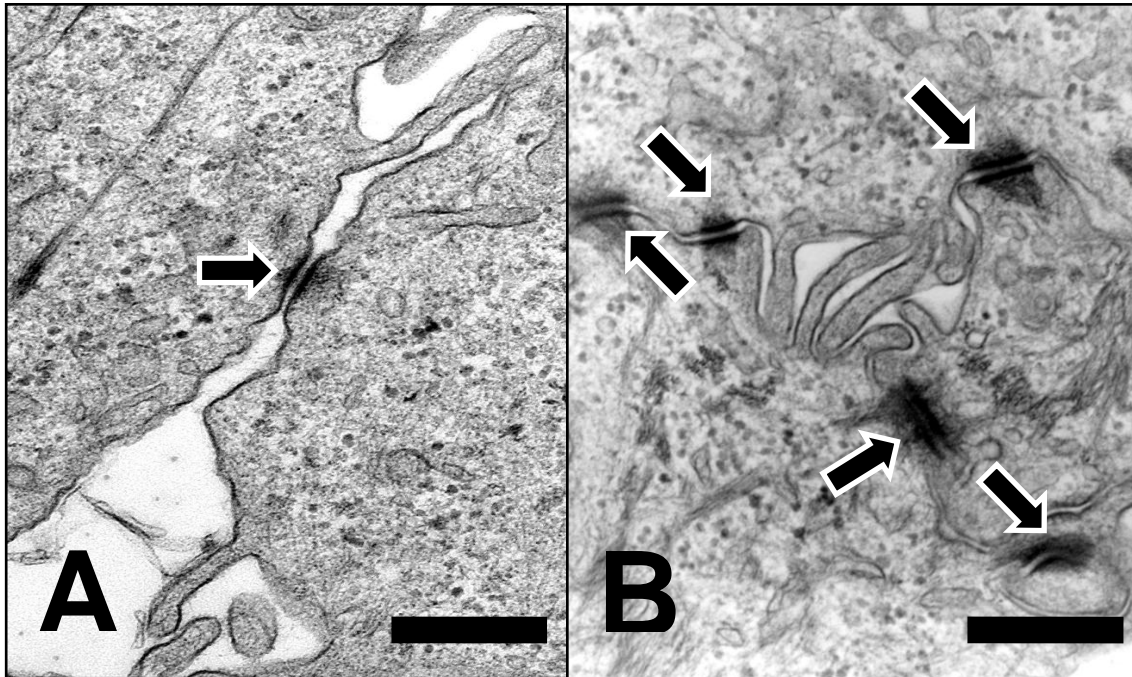


FIGURA 91: Fotografías tomadas mediante MET del epitelio de los sustitutos corneales de espesor parcial. La figura A muestra dos células epiteliales pertenecientes a un equivalente corneal inmaduro con dos capas de células epiteliales. La figura B corresponde a un constructo maduro, tras 15 días de cultivo aire-líquido, son visibles tres células epiteliales. Las flechas señalan uniones intercelulares tipo mácula adherente, las cuales son mucho más abundantes y están mejor configuradas en la figura B. La barra de escala indica 1 µm.

3.2 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL COMPONENTE ESTROMAL:

La observación mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión del componente estromal de los sustitutos corneales fabricados en el laboratorio, mostró una distribución homogénea de los queratocitos humanos dentro de los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% y la ausencia de retracción de los mismos. De igual modo, los queratocitos inmersos en estos geles conservaron una estructura similar a la que exhiben en las córneas nativas, mostrando numerosas prolongaciones laterales que les conferían una morfología estrellada. El crecimiento y la tasa de proliferación de los queratocitos inmersos en la matriz extracelular fueron muy activos. Por otro lado, el volumen y la naturaleza de la matriz extracelular no se modificó a lo largo del tiempo, no existiendo contracción del constructo (FIGURA 92).

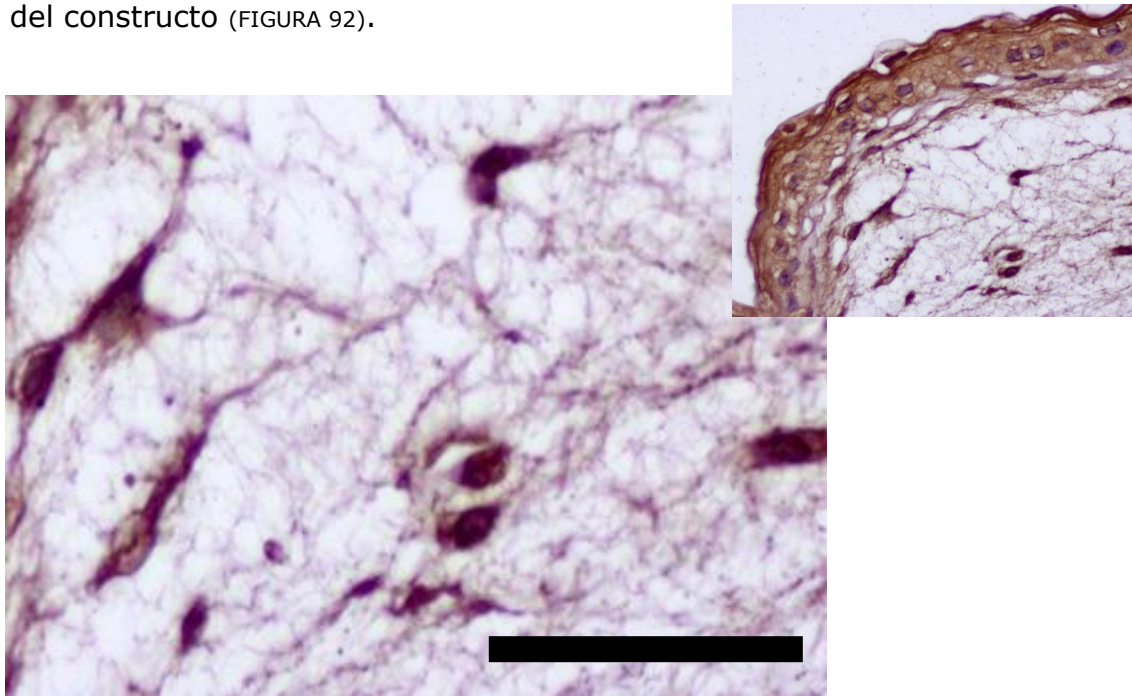


FIGURA 92: Constructo corneal humano de espesor observado mediante microscopía óptica. Abajo, detalle del componente estromal. La barra de escala indica 100 μm .

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON DESMOSOMAS MEDIANTE *MICROARRAY*:

La expresión de genes relacionados con la síntesis de uniones intercelulares tipo desmosoma se evaluó mediante los chips del sistema de *microarray* Affymetrix Human Genome U133 plus[®] de la casa comercial Affymetrix y se normalizó utilizando el programa informático Affymetrix Microarray Suite 5.0[®] suministrado por la casa comercial Affymetrix. En esta Tesis Doctoral hemos evaluado la expresión del ARNm responsable de la síntesis uniones intercelulares tipo desmosoma, en concreto, el análisis de expresión génica mediante *microarray* nos permitió cuantificar la expresión de desmocolina 1, 2 y 3, desmogleína 1, 2 y 3, desmoplaquina, placoglobina y placofilina 1, 2, 3 y 4, tanto a nivel de los equivalentes corneales, como en los cultivos primarios de las células epiteliales corneales y queratocitos estromales humanos establecidos a partir de las córneas nativas tomadas como control (Tabla III). A continuación, seleccionamos una proteína correspondiente a cada unidad estructural del desmosoma (placa densa, proteínas transmembrana y proteínas de unión) como modelo de estudio del comportamiento de los desmosomas en los distintos sistemas biológicos estudiados, así elegimos la desmoplaquina (principal constituyente de la placa densa desmosómica), la desmogleína 3 (una de las proteínas transmembrana que permite la unión intercelular a nivel de la mácula adherente) y la placoglobina (proteína intermediaria entre las proteínas transmembrana del desmosoma, desmogleína y desmocolina, y la desmoplaquina).

De este modo, pudimos comprobar que la expresión de ARNm codificante de placoglobina en los constructos corneales humanos

sometidos a cultivo aire-líquido fue similar a la encontrada en los cultivos primarios de epitelio corneal humano ($2198,45 \pm 495,75$ unidades de fluorescencia en constructos vs. $2122,70 \pm 59,68$ unidades de fluorescencia en cultivos primarios).

La expresión de ARNm codificante de desmogleína 3 fue mayor en los constructos sometidos a cultivo aire-líquido que en los cultivos primarios epiteliales ($3488,50 \pm 877,45$ unidades de fluorescencia en constructos vs. $2121,80 \pm 52,33$ unidades de fluorescencia en cultivos primarios).

Finalmente, la expresión de ARNm codificante de desmoplaquina fue superior en los constructos sometidos a cultivo aire-líquido a la hallada en los cultivos primarios de epitelio corneal ($4721,15 \pm 601,54$ unidades de fluorescencia en constructos vs. $2964,70 \pm 979,91$ unidades de fluorescencia en cultivos primarios) (Tabla IV).

Adicionalmente, los cultivos primarios de células epiteliales humanas mostraron una expresión de los tres genes estudiados al menos seis veces mayor que los cultivos primarios de queratocitos estromales humanos. La expresión de placoglobina en los cultivos primarios de queratocitos corneales humanos fue de $20,70 \pm 3,68$ unidades de fluorescencia; la expresión de desmogleína 3 en los cultivos primarios de queratocitos fue $6,92 \pm 2,16$ unidades de fluorescencia; finalmente, la expresión de desmoplaquina en los cultivos primarios de queratocitos fue $486,90 \pm 488,05$ unidades de fluorescencia (Tabla IV).

NOMBRE DEL GEN	SÍMBOLO DEL GEN	MEDIA Y DESV. TÍPICA DE CONSTRUCTOS	MEDIA Y DESV. TÍPICA DE CULTIVOS PRIMARIOS DE EPITELIO	MEDIA Y DESV. TÍPICA DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATOCITOS
Desmocolina 1	DSC 1	6,70+/-7,50	9,80+/-6,93	0,50+/-0,14
Desmocolina 2	DSC 2	903,67+/-137,18	1326,53+/-196,15	7,72+/-5,77
Desmocolina 3	DSC 3	983,18+/-272,98	689,93+/-80,93	8,58+/-2,79
Desmogleína 1	DSG 1	172,55+/-72,90	32,90+/-42,99	1,40+/-1,41
Desmogleína 2	DSG 2	686,68+/-205,59	1890,73+/-174,62	16,35+/-17,18
Desmogleína 3	DSG 3	3488,50+/-877,45	2121,80+/-52,33	6,93+/-2,16
Desmoplaquina	DSP	4721,15+/-601,45	2964,70+/-979,91	486,90+/-488,05
Placoglobina (junction placoglobin)	JUP	2198,45+/-495,75	2122,70+/-59,68	20,70+/-3,68
Placofilina 1	PKP 1	364,80+/-88,18	213,08+/-103,13	1,68+/-1,17
Placofilina 2	PKP 2	176,83+/-78,24	166,73+/-32,00	10,53+/-8,17
Placofilina 3	PKP 3	265,10+/-93,90	361,80+/-2,83	17,53+/-5,13
Placofilina 4	PKP 4	95,75+/-14,00	119,56+/-8,75	69,85+/-5,16

TABLA III: Valores normalizados (media y desviación típica) de la expresión de genes relacionados con la síntesis de desmosomas estudiados en esta Tesis Doctoral, cuantificación realizada mediante *microarray*.

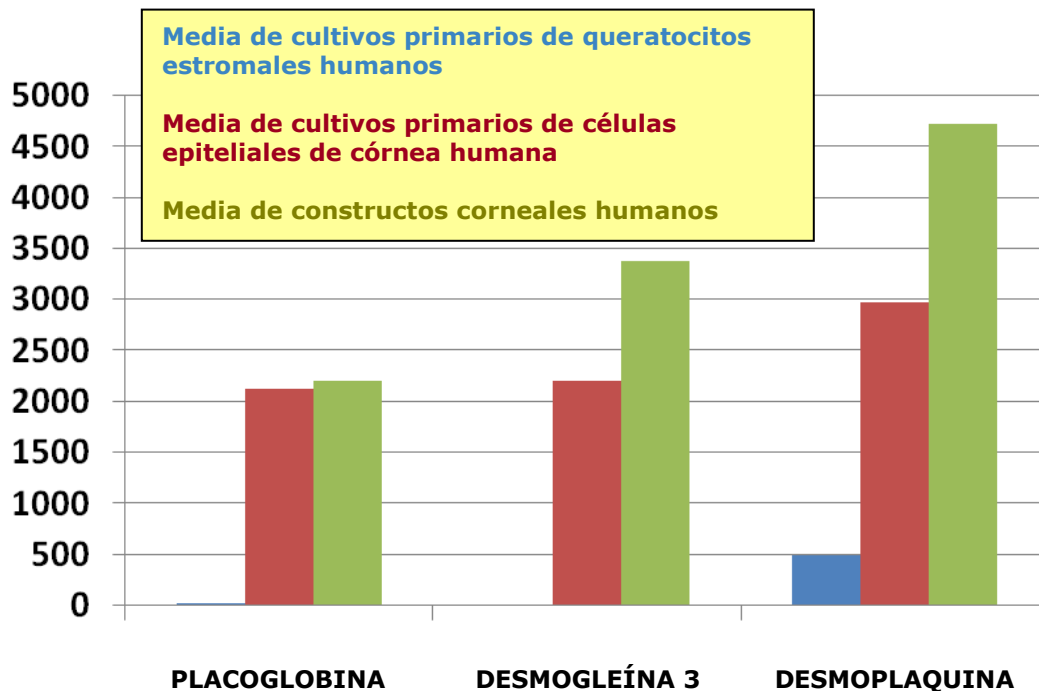


TABLA IV: Expresión media de ARNm de genes responsables de la síntesis de placoglobina, desmogleína 3 y desmoplaquina en constructos corneales humanos tras 15 días de cultivo aire-líquido, en cultivos primarios de epitelio corneal humano y en cultivos primarios de queratocitos estromales humanos (Valores normalizados).

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON DESMOSOMAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA:

De todas las proteínas estudiadas por *microarray* en este trabajo, se seleccionaron tres proteínas típicas de las tres unidades estructurales del desmosoma. Así, se eligió la desmogleína 3 como ejemplo de las proteínas transmembrana del desmosoma, la desmoplaquina por ser el principal constituyente de la placa densa desmosómica y la placoglobina por ser el elemento intermedio entre las dos anteriores. La detección de dichas proteínas a nivel del epitelio de los constructos corneales y de las córneas humanas nativas empleadas como control se realizó mediante inmunofluorescencia.

De este modo, pudimos comprobar que las córneas nativas control mostraron una elevada expresión de las tres proteínas en todos los estratos del epitelio, siendo mayor esta expresión en la zona media del epitelio, es decir, en las capas de células alares (FIGURA 93).

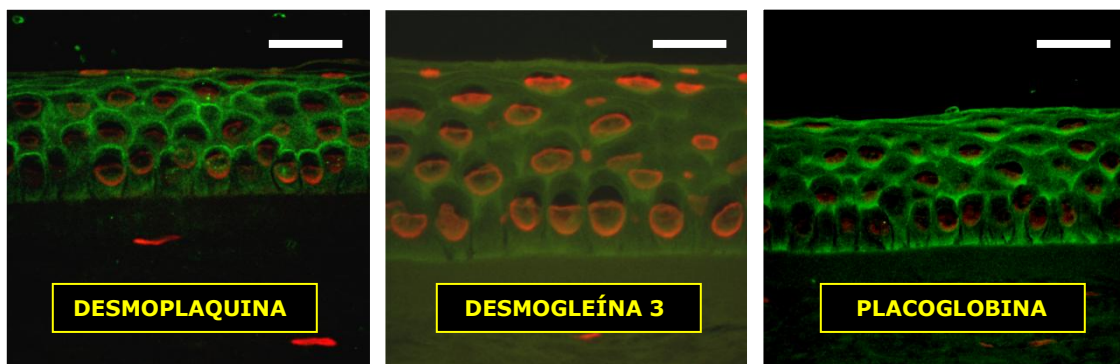


FIGURA 93: Córneas humanas control. Detección de desmoplaquina, desmogleína 3, y placoglobina a nivel epitelial mediante inmunofluorescencia. La barra de escala indica 30 μm .

En segundo lugar, el análisis de los constructos corneales demostró que la expresión de las distintas proteínas que constituyen el desmosoma se correlacionó de forma directa con el estadio de maduración de los diferentes constructos corneales. Así, en la etapa de equivalentes corneales inmaduros con una capa de células epiteliales no observamos expresión de placoglobina ni de desmogleína 3, siendo muy débil la expresión de desmoplaquina (FIGURA 94).

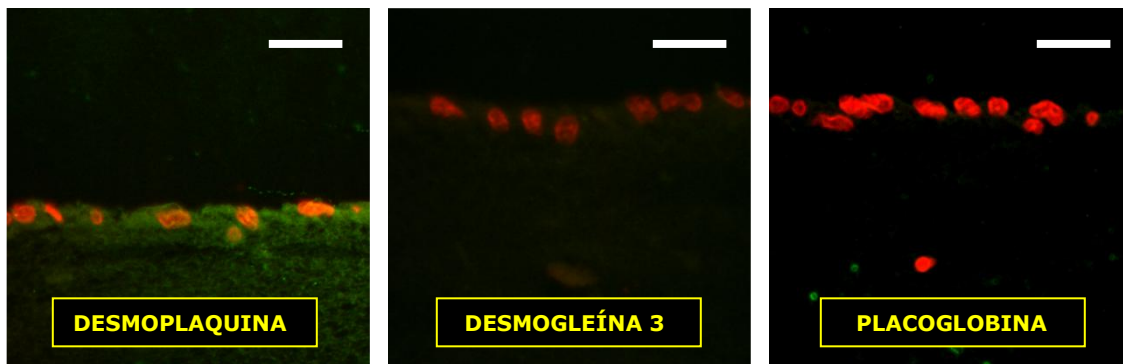


FIGURA 94: Constructos corneales humanos inmaduros con epitelio compuesto por una capa celular. Expresión de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina a nivel epitelial, detección realizada mediante inmunofluorescencia. La barra de escala indica 30 μ m.

Posteriormente, en los equivalentes corneales inmaduros con 2-3 capas de células epiteliales no detectamos la presencia de placoglobina, pero sí hallamos una expresión difusa de desmogleína 3 y desmoplaquina (FIGURA 95).

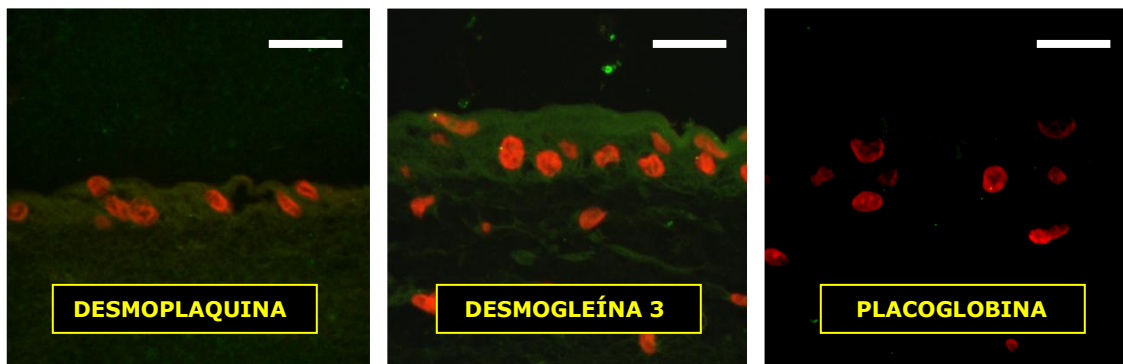


FIGURA 95: Constructos corneales humanos inmaduros con epitelio compuesto por 2-3 capas celulares. Expresión de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina a nivel epitelial evaluada mediante inmunofluorescencia. La barra de escala indica 30 μ m.

Tras 15 días de cultivo de los constructos en medio líquido, el epitelio de éstos, compuesto por 6-7 capas celulares, expresó las tres proteínas buscadas, pero a diferencia del epitelio corneal nativo la expresión de estas proteínas no fue mayor en los estratos de células alares sino que fue mayor en la mitad apical del epitelio (FIGURA 96).

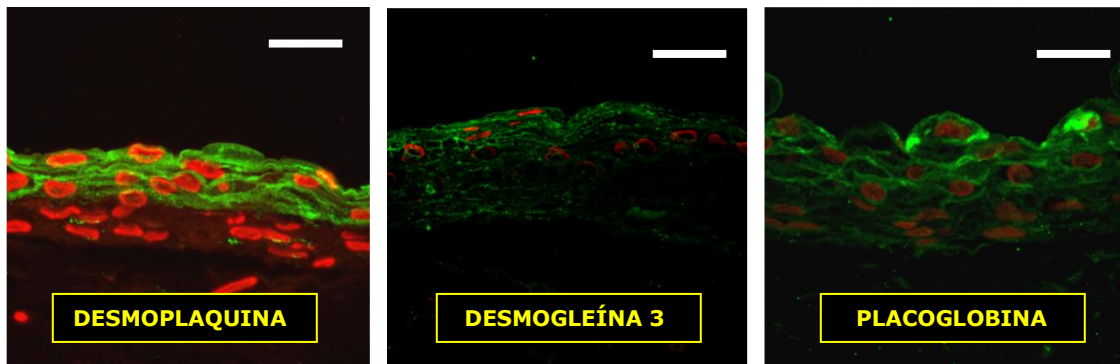


FIGURA 96: Constructos corneales humanos con epitelio inmaduro compuesto por 6-7 capas celulares. Expresión de desmoplakina, desmogleína 3 y placoglobina. Detección realizada mediante inmunofluorescencia. La barra de escala indica 30 μm .

Finalmente, los sustitutos corneales sometidos a cultivo aire-líquido presentaron un epitelio cuyo patrón de expresión de placoglobina, desmogleína 3 y desmoplakina fue similar al observado en epitelio corneal nativo, es decir, con una mayor expresión de las tres proteínas en los estratos de células alares y una expresión relativamente menor en las capas basales y apicales (FIGURA 97).

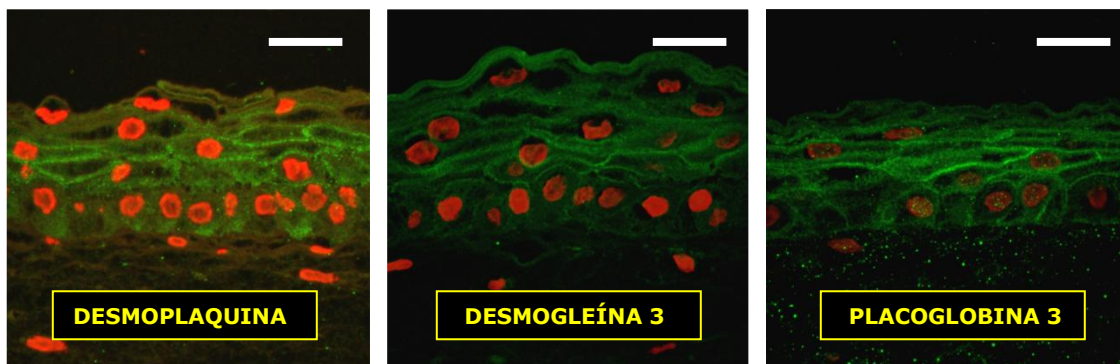


FIGURA 97: Constructos corneales humanos maduros, tras cultivo aire-líquido. Detección de desmoplakina, desmogleína 3 y placoglobina mediante inmunofluorescencia. La barra de escala indica 30 μm .

DISCUSIÓN

1. UTILIDAD DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES FABRICADOS EN LABORATORIO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR:

En la actualidad, la queratoplastia penetrante constituye la técnica quirúrgica empleada con mayor frecuencia en el tratamiento de la patología corneal grave (*Borene ML et al., 2004*). No obstante, el trasplante de córnea de espesor completo presenta varios inconvenientes, entre los que destacan los siguientes:

A) DISPONIBILIDAD DE CÓRNEAS PARA TRASPLANTE:

A pesar de los esfuerzos de las autoridades sanitarias y de la concienciación de la población, a día de hoy, la disponibilidad de órganos y tejidos para trasplante es menor que la demanda existente, lo que se traduce en listas de espera cada vez más extensas. El trasplante de córnea no constituye una excepción a esta realidad, y además, la expansión que actualmente está sufriendo la cirugía refractiva corneal (*Lamparter J et al., 2005*), puede empeorar aún más esta situación en un futuro relativamente próximo, ya que las córneas sometidas a este tipo de tratamiento no son aptas para trasplante (*Ousley PJ y Terry MA, 2002*). En los países con bajo nivel de desarrollo, aunque no existe el problema de la cirugía refractiva, razones de índole religiosa y cultural y la deficiente infraestructura sanitaria son las principales responsables de la limitada disponibilidad de córneas para trasplante.

B) POSIBILIDAD DE RECHAZO DEL INJERTO:

El origen heterólogo de los implantes corneales es la causa de una de las complicaciones más frecuentes y graves de la queratoplastia penetrante, el rechazo inmunológico del injerto. Este rechazo es el resultado de una reacción inmunológica dirigida frente a los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA) presentes en los tres tipos de células presentes en la córnea. El rechazo puede ser epitelial, frente a los queratocitos estromales o endotelial, siendo este último el más grave de los tres, ya que ocasiona una pérdida de células endoteliales que, al ser irreversible, y dada la baja tasa de proliferación de las células endoteliales en el humano adulto, puede provocar un edema crónico del injerto y por tanto el fracaso de éste (*Coster DJ y Williams KA, 2005*).

C) POSIBILIDAD DE TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES DEL DONANTE AL RECEPTOR:

Aunque los protocolos de los diferentes Bancos de Tejidos y Órganos incluyen la realización de serologías y de reacción en cadena de la polimerasa frente a distintas enfermedades infecciosas a los donantes, existen infecciones que pueden asociarse al trasplante de córnea y cuya detección, en ocasiones, escapa a este control. Revisando la literatura publicada sobre esta cuestión, encontramos casos de transmisión de diferentes virus como son, virus de la Inmunodeficiencia Humana Adquirida (*Caron MJ and Wilson R, 1994*), virus de la Hepatitis B y C (*Hoft RH et al., 1997*), virus de la Rabia (*Houff SA et al., 1999*) y virus del Herpes Simple (*Robert PY et al., 2005*), de enfermedad de Creutzfeld-Jakob y otros priones (*Heckmann JG et al., 1997*) (*Hogan RN et al., 1999*) (*Kennedy RH et al., 2001*), de diferentes parasitosis como son la enfermedad de Chagas (*Herrera L et al., 2006*) y de bacterias y hongos acantonados en la córnea (*Hassan SS et al., 2008*) (*Schotveld JH et al., 2005*). Por otra parte, también es posible la transmisión de enfermedades no infecciosas al receptor, como es el caso de degeneraciones y distrofias corneales en etapas iniciales (*Borderie VM et*

al., 2001) y de ciertos tumores oculares que afectan a la superficie ocular o al segmento anterior (*Mc George AJ et al., 2002*). Diferentes estudios con córneas procedentes de pacientes con melanomas coroides primarios confinados al segmento posterior y con córneas procedentes de pacientes con tumores extraoculares sin evidencia de actividad metastásica a nivel orbitario no han mostrado que exista riesgo de transmisión de dichas neoplasias al receptor (*Harrison DA et al., 1995*) (*Salame N et al., 2001*).

La posibilidad de elaborar tejidos autólogos a demanda, generados por Ingeniería Tisular a partir de células extraídas del propio paciente mediante pequeñas biopsias, acabaría con las listas de espera para recibir un trasplante, con los rechazos inmunológicos puesto que habría identidad inmunológica total entre donante y receptor y con la posibilidad de transmitir cualquier tipo de enfermedad, infecciosa o no infecciosa al receptor (*Nishida K, 2003*). Esta es una de las principales razones por las que los equivalentes corneales desarrollados mediante Ingeniería Tisular se postulan como una alternativa a la queratoplastia penetrante y a otros tipos de queratoplastia, así como a las queratoprótesis a la hora de restaurar la agudeza visual o la estructura corneal perdidas (*Duan D et al., 2006*). En la actualidad, son múltiples los grupos de investigación que trabajan en la elaboración de sustitutos corneales mediante Ingeniería Tisular, y numerosos y rápidos los avances que se están produciendo en este campo (*Griffith M et al., 1999*) (*Minami Y et al., 1993*) (*Orwin EJ y Hubel A, 2000*) (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*) (*Schneider AI et al., 1999*) (*Zieske JD et al., 1994*).

Pero este no es el único motivo que apoya esta disciplina de la Ingeniería Tisular. Si ya es difícil obtener córneas para trasplante, aún más difícil es conseguirlas para la experimentación. Este es el motivo por el cual muchos estudios fisiológicos y farmacológicos se realizan en animales. Sin embargo, la experimentación con animales cuenta con la oposición de

grupos ecologistas y de sociedades protectoras de animales. Además, desde hace al menos quince años, numerosas directrices de la Unión Europea se han centrado en la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, haciendo hincapié en la búsqueda de sistemas biológicos *in vitro* que sustituyan a la experimentación con animales vivos (resoluciones 86/C331/02, DOCE L222 24/08/1999, DOCE L44 20/02/1990, DOUE L230 16/09/2003 y DOUE L198 6/08/2003 de la Unión Europea). Llegados a este punto, los equivalentes corneales de origen animal o humano podrían ser empleados para estudiar, *in vitro*, eficacia, toxicidad, penetración en los tejidos oculares de diferentes fármacos sin la necesidad de utilizar animales vivos ni perder córneas humanas aptas para trasplante (Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003) (Reichl S et al., 2004) (Tegtmeyer S et al., 2001).

2. GENERACIÓN DE EQUIVALENTES CORNEALES HUMANOS CON EPITELIO ORTOTÍPICO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR:

2.1 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES Y ESTROMALES DE CÓRNEA HUMANA:

En el presente trabajo, hemos conseguido aislar y cultivar dos de los tres principales tipos celulares que componen la córnea humana: células epiteliales y queratocitos estromales. Las células corneales así aisladas son la base para la elaboración de sustitutos corneales organotípicos mediante Ingeniería Tisular, pero también pueden ser empleadas para la realización de estudios fisiológicos, ensayos farmacológicos en laboratorio, etc. Así, en el tratamiento de la insuficiencia límbica, se están empleando implantes de células madre del epitelio límbico expandidas *ex vivo* sobre soportes de membrana amniótica (*Kim MK et al., 2005*) (*Koizumi N et al., 2001*) (*Ma DH et al., 2004*).

2.1.1 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES:

En lo referente a los cultivos de células epiteliales corneales, la técnica empleada, basada en el cultivo de fragmentos de limbo esclero-corneal, proporcionó una elevada eficacia a la hora de generar cultivos celulares confluentes. Frente a técnicas más complejas en las que en primer lugar se individualizan las células madre del epitelio límbico, la técnica de

segmentos corneales es sencilla, puede llevarse a cabo incluso con fragmentos de tejido límbico de reducido tamaño y es capaz de generar un elevado número de células epiteliales corneales en un período de tiempo relativamente corto.

Una vez obtenidos los fragmentos límbicos, el cultivo de células epiteliales corneales puede establecerse en presencia o en ausencia de células de soporte 3T3. Las células 3T3 (ECACC 85022108) proceden del tejido conectivo de fetos de ratones de laboratorio y presentan una tasa de proliferación muy elevada, por lo que es necesario inactivarlas previamente (*Rheinwald JG y Green H, 1975*) (*Rheinwald JG y Green H, 1975*). Esta inactivación puede llevarse a cabo de diversas formas, destacando la irradiación (6000 rads) o mediante el empleo de mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (10 mg/ml) durante 2 horas a 37°C. La presencia de estas células en el cultivo asegura una gran disponibilidad de factores de crecimiento, lo que según algunos autores se asocia a una mayor velocidad de crecimiento de los cultivos de células epiteliales (*Germain L et al., 2000*) (*Talbot M et al., 2006*). No obstante, otros trabajos en los que se compara la velocidad de crecimiento de las células epiteliales corneales en presencia y en ausencia de células alimentadoras 3T3 no han encontrado dicha relación (*Alaminos M et al., 2006*) (*Muñoz-Ávila JI, 2006*). En la presente Tesis Doctoral, optamos por un cultivo en medio MP en ausencia de células alimentadoras 3T3, obteniendo unos resultados excelentes.

En la actualidad, los cultivos de células del epitelio corneal humano están siendo utilizados en el tratamiento de patología de la superficie ocular. Así, en el tratamiento de la insuficiencia límbica, se están empleando implantes de células madre del epitelio límbico expandidas *ex vivo* sobre soportes de membrana amniótica (*Kim MK et al., 2005*) (*Koizumi N et al., 2001*) (*Ma DH et al., 2004*). También, se están realizando trasplantes de epitelio autólogo cultivado para disminuir la incidencia de opacidades tipo *Haze* tras queratectomía fotorrefractiva, para acelerar la

curación y evitar la aparición de leucomas en pacientes con defectos epiteliales persistentes y para intentar disminuir la incidencia de recidivas y la formación de opacidades corneales en pacientes sometidos a queratectomía fototerapéutica por diferentes distrofias corneales (*Hayashida Y et al., 2006*). La farmacología es otra disciplina científica que se está beneficiando del epitelio corneal cultivado en laboratorio. Con esta finalidad, se están utilizando cultivos de células epiteliales para realizar los ensayos de toxicidad de algunas soluciones de conservación de lentes de contacto (*McCanna DJ et al., 2008*), para valorar la toxicidad debida al principio activo y a los conservantes de diferentes productos farmacológicos (*Dutot M et al., 2006*), para estudiar la biocompatibilidad de polímeros que puedan emplearse como agentes viscoelásticos o con los que se elaboren los implantes empleados en la cirugía ocular, o que constituyan las matrices con las que se fabriquen equivalentes corneales organotípicos (*Huhtala A et al., 2007*), etcétera.

2.1.2 CULTIVO DE QUERATOCITOS DEL ESTROMA CORNEAL:

En nuestros cultivos, los queratocitos estromales han mostrado una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en el medio de cultivo exento de factores de crecimiento empleado. Estos resultados coinciden con los encontrados y publicados anteriormente por otros investigadores (*Alaminos M et al., 2006*) (*Muñoz-Ávila JI, 2006*) (*Orwin EJ y Hubel A, 2000*) (*Teixeira AI et al., 2004*).

Una vez aislados y cultivados, los queratocitos pueden emplearse en la síntesis de equivalentes corneales compuestos de epitelio y estroma, como presentamos en esta Tesis Doctoral, pero también pueden emplearse con otras finalidades. Recientemente se han implantado matrices biocompatibles con queratocitos sembrados en su interior para tratar úlceras corneales en modelos porcinos. Los resultados de este trabajo muestran una rápida epitelización y recuperación de grosor de dichas úlceras, así como el mantenimiento de una aceptable transparencia de estos implantes y la inervación de los mismos a partir de la semana 16 desde el implante (*Zhang C et al., 2007*). Los queratocitos cultivados también pueden ser empleados en estudios sobre fisiología corneal, para comprender su funcionamiento y dilucidar el efecto de diferentes sustancias sobre el mismo, así como determinar el número de pases en cultivo que pueden soportar sin perder sus propiedades, y todo ello sin tener que recurrir a la utilización de animales ni córneas humanas intactas (*Ravelojaona V et al., 2008*). Otra aplicación de los queratocitos cultivados es su utilización para la realización de estudios farmacológicos. De esta manera pueden probarse nuevos fármacos para determinar sus posibles efectos y hacer estudios de toxicidad (*Bezwada P et al., 2007*). Finalmente, también pueden ser empleados en Ingeniería Tisular en la búsqueda de un sustituto estromal ideal. En este sentido, podemos citar un

estudio realizado con células madre del estroma corneal humano. Una vez aisladas, las células madre cultivadas en un medio de cultivo sin suero, sufren una diferenciación fenotípica hacia queratocitos, siendo capaces de producir abundantes fibrillas de colágeno que incluso llegan a alinearse de forma similar a como lo hace el colágeno del estroma corneal (*Du Y et al., 2007*).

2.2 FABRICACIÓN DE SUSTITUTOS ESTROMALES:

La especial estructura del estroma corneal lo dota de unas propiedades difíciles de reproducir. Son múltiples los trabajos sobre Ingeniería Tisular de la córnea y múltiples los materiales y las técnicas empleadas para lograr un sustituto estromal cuyas propiedades se parezcan lo más posible a las del estroma corneal, incluyendo transparencia, consistencia, poder dióptrico, etcétera. Además, estos sustitutos estromales deben permitir el desarrollo y la correcta adhesión del epitelio y del endotelio corneal sobre ellos.

Como sustituto del estroma corneal humano en este trabajo hemos empleado un gel de fibrina humana y agarosa al 0,1% con queratocitos humanos inmersos en su interior. Para la fabricación de dicho sustituto, una vez aisladas y cultivadas las células epiteliales y los queratocitos humanos, utilizamos soportes porosos para cultivo celular Transwell® (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*). Los sustitutos estromales así elaborados mostraron una adecuada transparencia y una consistencia que permitió la realización de suturas sobre ellos. Por otro lado, estos geles de fibrina humana y agarosa permitieron una buena adhesión del epitelio desarrollado sobre ellos y no mostraron la retracción que con frecuencia se observa en las matrices de colágeno tipo I, lo que resulta compatible con los trabajos de otros autores (*Alaminos M et al., 2006*) (*Muñoz-Ávila JI, 2006*) (*Nishida K et al., 2004*).

2.3 DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL HUMANO:

Para la elaboración de equivalentes corneales humanos de espesor parcial con epitelio ortotípico, utilizamos una técnica secuencial de cultivo empleando soportes porosos para cultivo celular Transwell® (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*). La elección de este sistema se fundamentó en la membrana porosa que dichos soportes presentan en su base. Esta membrana permite, una vez creado un sustituto del estroma humano, en nuestro caso, un gel de fibrina humana y agarosa al 0,1% con queratocitos humanos en su interior, y tras la siembra sobre el mismo de las células epiteliales humanas previamente cultivadas, el desarrollo de una técnica de cultivo aire-líquido (*Sánchez-Quevedo MC et al., 2007*). De este modo, una vez sembradas las células epiteliales corneales sobre los sustitutos estromales, los equivalentes se mantuvieron completamente sumergidos en el medio de cultivo durante quince días. Pasado este tiempo los constructos corneales humanos se sometieron a una técnica de cultivo aire-líquido durante otros quince días.

El cultivo aire-líquido es una técnica empleada en Ingeniería Tisular con la finalidad de favorecer la estratificación y maduración de los epitelios generados en laboratorio (*Geroski HD y Hadley A, 1992*) (*Hutak CM et al., 2002*) (*Limat A et al., 2003*) (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*) (*Richard NR et al., 1991*) y con este objetivo ha sido empleada por diversos autores en la generación de sustitutos corneales de espesor total o parcial (*Chang JE et al., 2000*) (*Kawazu K et al., 1998*) (*Richard NR et al., 1991*). La presencia de un epitelio estratificado con abundantes uniones intercelulares tipo desmosoma que le dan cohesión interna es la base de algunas propiedades corneales de gran importancia, como son, de un lado,

constituir una barrera frente a diversos agentes externos y, de otro lado, regular la pérdida de agua y electrolitos hacia el exterior (*Fischbarg J y Maurice DM, 2004*) (*Reichl S et al., 2004*) (*Toropainen E et al., 2001*). A la hora de desarrollar nuestros sustitutos corneales de espesor parcial hemos intentado que éstos desarrollasen un epitelio ortotípico, es decir, lo más parecido posible al epitelio corneal humano para asegurar esta función de barrera que resulta clave si queremos obtener equivalentes corneales que verdaderamente tengan aplicación en investigación y en la práctica clínica. Con tal finalidad hemos empleado la técnica de cultivo aire-líquido y hemos procedido al estudio de los equivalentes así generados mediante microscopía óptica y electrónica, *microarray* e inmunofluorescencia en distintos momentos de su maduración. Estas técnicas han puesto de manifiesto cómo el epitelio corneal generado en laboratorio, inicialmente presenta una baja cohesión interna y que su sometimiento a una técnica de cultivo aire-líquido es capaz de inducir el desarrollo progresivo de uniones intercelulares tipo desmosoma y la maduración de las mismas. Durante el tiempo en que los constructos se mantuvieron sumergidos por completo, las tres proteínas analizadas (desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina) presentaron una mayor expresión en la mitad apical del epitelio. El cultivo aire-líquido consiguió, no sólo la maduración de las uniones intercelulares tipo desmosoma del epitelio, sino que también logró que la distribución de las mismas dentro del epitelio de los constructos fuese análoga a la observada en el epitelio corneal nativo. De este modo, tras quince días de cultivo en condiciones aire-líquido, la mayor densidad de uniones intercelulares tipo desmosoma se encontró en los estratos de células alares.

Si comparamos la ontogenia del epitelio corneal humano con los resultados de nuestro estudio, observaremos cómo la generación de un epitelio corneal humano apoyándonos en la técnica de cultivo aire-líquido consigue reproducir *in vitro* el desarrollo embrionario del epitelio corneal humano. Trabajos realizados con embriones y fetos procedentes de abortos nos muestran que, inicialmente, hacia la quinta semana, el epitelio corneal

humano consta de dos capas celulares, una basal cuboidea y una apical aplanada. Una o dos semanas después, pasa a estar formado por tres o cuatro capas celulares, mostrando la capa basal una morfología cuboidea, la capa apical una morfología aplanada y, la/las capa/capas intermedia/intermedias un aspecto intermedio entre las anteriores. En embriones de unos 36 mm, momento en el cual los párpados se fusionan, el epitelio corneal reduce su espesor y vuelve a estar constituido por dos capas celulares, una capa basal cuboidea y una capa apical aplanada. Cuando los párpados terminan su desarrollo y dejan de estar fusionados, hecho que ocurre en fetos de unos 210 mm (hacia la semana veinticuatro de edad gestacional), el epitelio corneal se encuentra formado por unas cuatro o cinco capas celulares. Desde este momento, hasta el momento del parto, los cambios en el epitelio corneal son mínimos, de modo que en el feto a término la córnea posee un epitelio compuesto por cinco o seis capas celulares con uniones intercelulares inmaduras y más abundantes en la mitad apical del epitelio (*Sevel D y Isaacs R, 1988*).

El desarrollo embrionario del epitelio corneal y la maduración del mismo en el período postnatal también ocurren, de forma similar, en otras especies de mamíferos. Estudios realizados con ratas ponen de manifiesto que en el momento del nacimiento el epitelio corneal del ratón está formado por una única capa celular. Hacia el día doce o catorce, momento en que se abren los párpados, se convierte en un epitelio estratificado de unas cuatro o cinco capas celulares y, posteriormente sufre un proceso de maduración hasta dar lugar a un epitelio de unas características similares a las del adulto (FIGURA 98) (*Chung EH et al., 1992*) (*Zieske JD, 2004*) (*Zieske JD y Wasson ME, 1993*). Inicialmente, se trata de un mosaico celular desordenado que, a lo largo de las doce semanas que siguen al nacimiento va siendo sustituido por un mosaico regular gracias a la maduración de las células madre límbicas y a la migración de las células amplificadoras transitorias tardías por ellas generadas (*Chung EH et al., 1992*) (*Collinson JM et al., 2002*) (*Cotsarelis G et al., 1989*).

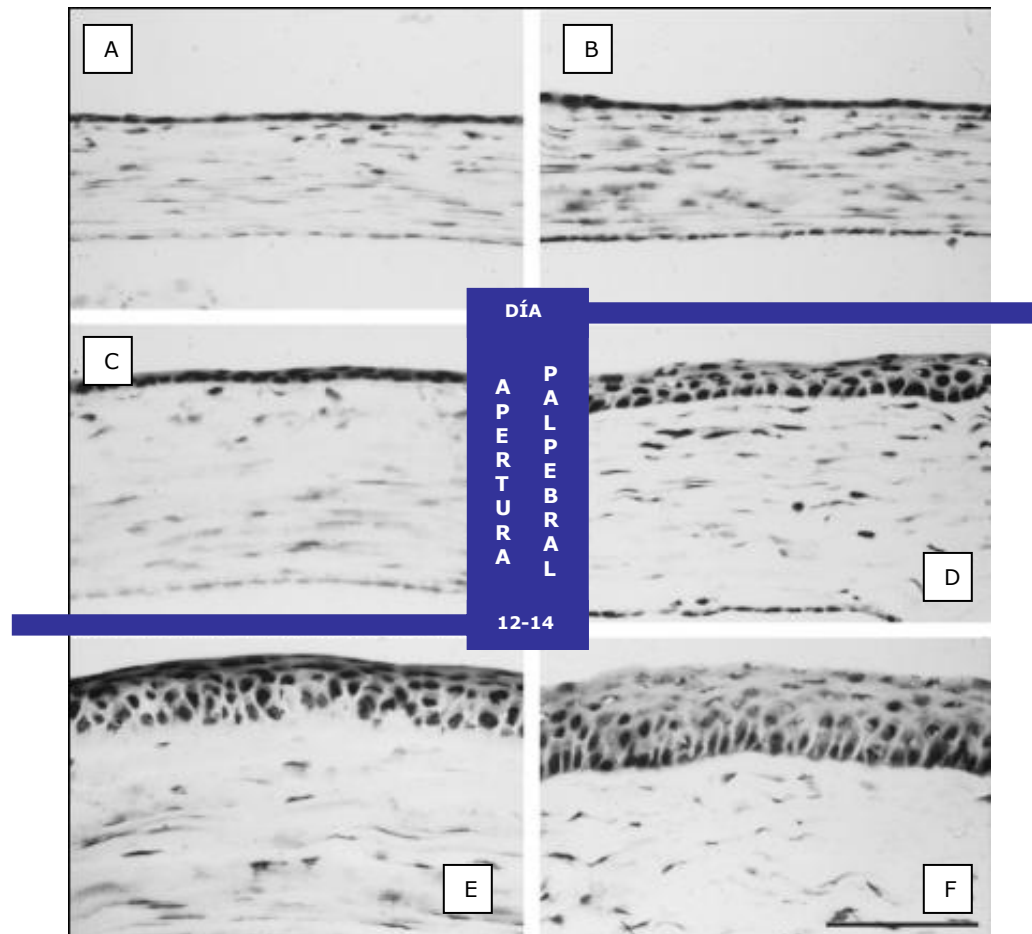


FIGURA 98: Desarrollo postnatal del epitelio corneal central en ratas. A) Día 1 tras nacimiento: epitelio compuesto por una única capa celular. B) Día 7 tras nacimiento: el epitelio continúa constituido por una capa celular. C) Día 10 tras nacimiento: justo antes de la apertura palpebral el epitelio se encuentra constituido por dos o tres capas celulares. D) Día 14 tras nacimiento: en el momento de la apertura palpebral el epitelio se compone de cuatro o cinco capas celulares. E) Día 21 tras nacimiento: cinco o seis capas celulares. F) Día 28 tras nacimiento: el epitelio es indistinguible del epitelio del control adulto.

Puede observarse la transformación sufrida por las células basales, que pasan de ser planas a columnares. Paralelamente, se produce un aumento de grosor del estroma y una disminución de la densidad de queratocitos, más acusados entre el día 7 y 10.

La barra de escala indica 50 μm .

(Tomado de Chung EH et al., 1992).

El proceso de estratificación del epitelio corneal también tiene lugar como parte del proceso de reparación de lesiones epiteliales corneales. En la mayoría de casos, durante las etapas iniciales del desarrollo corneal y de la reparación de defectos epiteliales, se genera un epitelio simple (Pei YF y Rhodin JA, 1971) (Suzuki K et al., 2000) (Zhang L et al., 2003). A continuación, las células basales proliferan y migran hacia la superficie para formar un epitelio estratificado compuesto por cinco o seis capas celulares. Algo similar es lo que hemos observado durante la elaboración de nuestros constructos, lo que sugiere que la estratificación de los mismos ocurre emulando el proceso fisiológico de estratificación del epitelio corneal (Cowin P et al., 1984) (Chung EH et al., 1992) (Beuerman RW y Pedroza L, 1996). Paralelamente, hemos detectado que la activación de genes codificantes de proteínas constituyentes de desmosomas y la síntesis de las mismas es un proceso secuencial dependiente del grado de estatificación del epitelio, al igual que ocurre durante el desarrollo embrionario del epitelio corneal. Durante el tiempo en que nuestros constructos exhiben una monocapa epitelial confluyente en su superficie, únicamente se detecta una débil expresión de desmoplaquina, lo que también ha sido puesto de manifiesto por estudios realizados sobre la embriología del epitelio corneal (Zhang L et al., 2003). El papel de la desmoplaquina es fundamental para el anclaje de los filamentos de citoqueratina del citoesqueleto y, a la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, su aparición parece previa a la aparición de la mácula desmosómica (FIGURA 99).

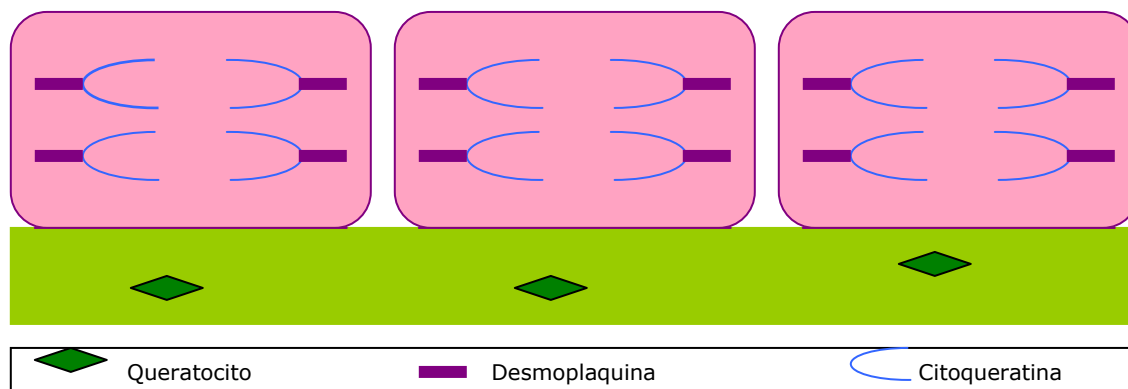


FIGURA 99: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por una única capa celular. Expresión de desmoplaquina.

Cuando el epitelio corneal alcanza los 2-3 estratos una nueva proteína es expresada junto con la ya existente. Se trata de la desmogleína 3, una de las proteínas transmembrana que constituyen el desmosoma y perteneciente a la familia de las cadherinas. La desmogleína 3 posee un dominio intracelular que permite su unión a la desmoplaquina y un dominio extracelular que se vincula con los dominios extracelulares de otras moléculas de desmogleína presentes en las células adyacentes (FIGURA 100). Esta apreciación implica que la estratificación del epitelio corneal conlleva, desde sus inicios, un nivel mayor de cohesión intercelular que el observado en el epitelio corneal compuesto por una única hilera celular.

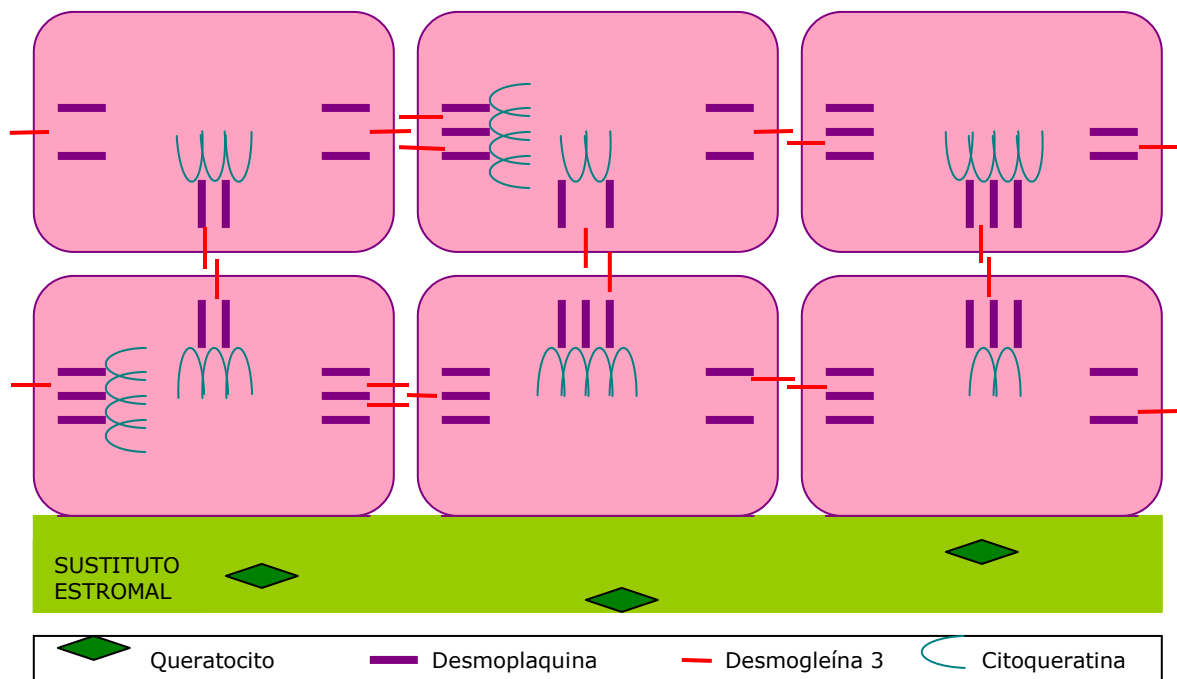


FIGURA 100: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por 2 estratos celulares. Expresión de desmoplaquina y desmogleína 3.

En la fase en la que el epitelio de los constructos corneales humanos inmaduros alcanza los 6-7 estratos, nuestros resultados ponen de manifiesto la aparición de un tercer tipo de proteína constituyente del complejo desmosómico. Esta proteína es la placoglobina, proteína que juega un papel fundamental en el anclaje de las dos anteriores, permitiendo la conformación de una estructura desmosómica completa al ensamblar los

dominios extracelulares de dicho complejo con los filamentos de citoqueratina que previamente han confluído hacia la placa densa desmosómica (FIGURA 101). La exposición de los constructos corneales humanos a una técnica de cultivo aire-líquido conlleva, según nuestros resultados, la maduración de los desmosomas existentes al mismo tiempo que implica una disminución de la expresión de las proteínas constituyentes de los desmosomas en los estratos apicales del epitelio corneal.

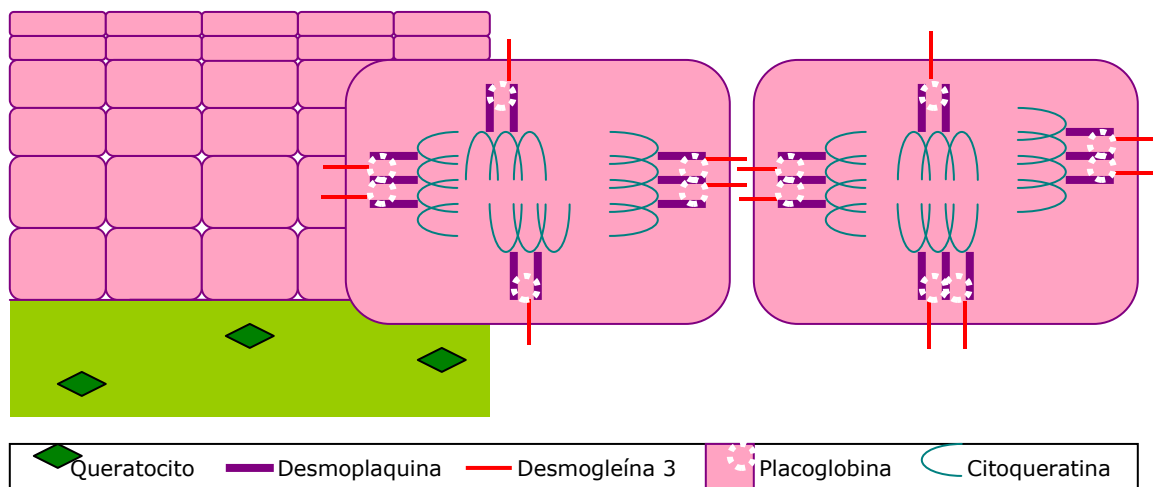


FIGURA 101: Epitelio corneal humano inmaduro compuesto por 6 estratos celulares. Expresión de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina.

Una posible explicación a esta observación es que durante el período en que el epitelio está constituido por una única capa celular, sus células presentan una alta actividad proliferativa, a la vez que necesitan poder migrar para constituir estratos suprabasales y permitir así la progresiva estratificación del epitelio corneal. En el momento en que el epitelio de los constructos alcanza la estratificación, comienza un proceso secuencial de expresión de proteínas desmosómicas que conduce a la formación de uniones intercelulares tipo desmosoma. Inicialmente se trata de estructuras incompletas y poco numerosas, que a la vez que va aumentando el número de capas celulares que constituyen el epitelio van adquiriendo los componentes inicialmente deficitarios y haciéndose más abundantes. Finalmente, la exposición del epitelio a una técnica de cultivo aire-líquido

consigue la maduración completa de los desmosomas del epitelio, al mismo tiempo que hace que éstos presenten una distribución similar a la que presentan en el epitelio corneal control.

Todos esos resultados sugieren que el epitelio corneal desarrollado por Ingeniería Tisular forma una barrera estrecha, a la vez que, la menor densidad de uniones intercelulares tipo mácula adherente en los estratos basales permitiría el movimiento horizontal (componente Y de Thoft y Friend) de las células basales del epitelio y la menor densidad en los estratos apicales posibilitaría la descamación (componente Z) de las células apicales del epitelio. Estas razones, harían de los constructos corneales así generados, herramientas valiosas para su utilización como sustitutos la córnea nativa para propósitos *in vivo* o *in vitro* o para estudios farmacológicos (Ebertz SL y McGann LE, 2004) (Hornof M et al., 2005) (Kawazu K et al., 1998) (Reichl S et al., 2004) (Tegtmeyer S et al., 2001) (Toropainen E et al., 2001). En el campo de la investigación, estos sustitutos podrían ser muy útiles para llevar a cabo estudios de absorción de fármacos dentro de los tejidos oculares (Reichl S et al., 2004) (Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003) (Tegtmeyer S et al., 2001), para la investigación de condiciones oculares patológicas y para la realización de estudios de toxicidad *in vitro* sin la necesidad de utilizar animales de laboratorio, o para valorar *in vivo* la eficacia y posibles efectos adversos de nuevos fármacos al instilarlos en ojos de animales sometidos a queratoplastias lamelares anteriores. En lo referente a la práctica clínica, aunque no son aptos para la realización de queratoplastias penetrantes ni lamelares posteriores por carecer de endotelio, sí que podrían emplearse en queratoplastias lamelares anteriores, contribuyendo así a acortar las largas listas de espera y evitando el rechazo inmunológico y el riesgo de transmisión de enfermedades en los casos en que el ojo adelfo permita la realización de una biopsia para obtener células autólogas a partir de las cuales elaborar un sustituto corneal a medida del paciente.

3. RETOS PARA EL FUTURO:

3.1 CULTIVO DE ENDOTELIO CORNEAL HUMANO:

Aunque tradicionalmente se defendía la incapacidad del endotelio corneal humano para proliferar una vez alcanzado su desarrollo, diversos estudios han puesto de manifiesto que el endotelio de la córnea humana posee capacidad proliferativa. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en otras especies animales como el conejo, la rata o los bóvidos, se trata de una capacidad proliferativa limitada y que se reduce con la edad (*Raymond GM et al., 1986*) (*Joyce NC, 2003*). La alta tasa de proliferación de las células endoteliales corneales de conejo, por ejemplo, permite obtener un elevado número de células endoteliales a partir de pequeños explantes procedentes de cadáver e incluso a partir de pequeñas biopsias tomadas *in vivo*. Esto ha posibilitado la fabricación, mediante Ingeniería Tisular, de equivalentes corneales de espesor completo a partir de las tres estirpes celulares de la córnea del conejo (*Alaminos M et al., 2006*). En el otro lado de la balanza se sitúa el endotelio corneal humano. Aunque algunos autores han conseguido llevar a cabo su cultivo (*Joyce NC, 2003*) (*Sumide T et al., 2006*), las células del endotelio corneal humano y de los primates presentan un índice de proliferación muy bajo, lo que hace que sean muy difíciles de mantener en cultivo (*Joyce NC, 2003*) e impide, por el momento, la elaboración de sustitutos corneales humanos de espesor completo. La obtención de cultivos de células endoteliales humanas permitiría, no sólo, elaborar equivalentes corneales humanos compuestos por células de las tres estirpes principales de la córnea, sino también, la realización de queratoplastias lamelares posteriores cultivando dichas células sobre soportes adecuados como pueden ser láminas de colágeno tipo I o membrana amniótica. En macacos cinomolgos afectos de

descompensación endotelial y sometidos a trasplante de endotelio cultivado sobre colágeno tipo I, se ha observado cómo las células endoteliales trasplantadas expresan la proteína ZO-1 y presentan actividad Na/K-ATPasa, lo cual va acompañado de una reducción del grosor corneal y de la recuperación de la transparencia corneal (Koizumi N et al., 2007).

Una posible solución al problema del endotelio humano puede pasar por el empleo de las células madre adultas existentes en el tejido adiposo y en la médula ósea (De Ugarte DA et al., 2003) (Zuk PA et al., 2002). En la actualidad se ha conseguido transdiferenciar dichas células hacia hueso (Hicok KC et al., 1998), cartílago (Goessler UR et al., 2008) (Nathan S et al., 2003), músculo estriado (Bacou F et al., 2004), músculo cardiaco (Antonitsis P et al., 2008), endotelio vascular (Miranville A et al., 2004) (Wu Y et al., 2007), hígado (Banas A et al., 2007) o neuronas (Lei Z et al., 2008), lo que permite ser optimista de cara a un futuro probablemente no muy lejano.

3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL SUSTITUTO ESTROMAL HUMANO:

Repasando los avances en la Ingeniería Tisular de la córnea podemos apreciar cómo uno de los campos en los que existe una bibliografía más prolífica y con más diferencias entre unos grupos de trabajo y otros, es precisamente, el referente a la elaboración del componente estromal de los constructos corneales. Esto es debido, a que, aunque en la actualidad contamos con diferentes materiales y técnicas que pueden ser empleados en la fabricación de sustitutos estromales, ninguno de ellos presenta unas propiedades cien por cien análogas a las del estroma corneal. El colágeno tipo I tiene los inconvenientes de su falta de transparencia, la retracción que sufre y su alto precio, la fibrina posee una consistencia débil y una mala transparencia, la agarosa ofrece una buena transparencia y consistencia pero las células corneales presentan una escasa supervivencia en ella, etcétera. El material más ampliamente utilizado en la Ingeniería Tisular de la córnea es el colágeno tipo I y sus dos principales problemas, la falta de transparencia y la retracción que sufre, están intentando ser solventados de diversas formas, entre las que destacan el entrecruzamiento químico (*Vrana NE et al., 2007*) o fotoquímico con riboflavina (*Isubuki S et al., 2007*) y la adición al colágeno de diversos glicosaminoglicanos como el condroitinsulfato (*Orwin EJ et al., 2003*). Para mejorar la adhesión de las células epiteliales al sustituto estromal y favorecer el desarrollo de un epitelio estratificado se pueden añadir diferentes sustancias al colágeno tipo I como el alcohol polivinílico (*Miyahsita H et al., 2006*) o distintos péptidos de adhesión epitelial (p. ej. YIGSR, YIGSRKVVAV, IKVVYIGSR) unidos a dendrímeros que además actúan como *cross-linkers* (*Duan X y Sheardown H, 2007*) evitando la retracción y mejorando la transparencia de estas matrices, a la vez que carece de la toxicidad celular observada con el entrecruzamiento químico (*Duan X y Sheardown H, 2006*).

Nuestro sustituto estromal a base de fibrina humana y agarosa al 0,1% proporciona una adecuada transparencia y consistencia, no experimenta retracción y permite la supervivencia de los queratocitos corneales en su interior y la adhesión del epitelio corneal sobre él. Trabajos realizados con células corneales de conejo han mostrado que permite la adhesión del endotelio corneal, lo que lo haría viable para la elaboración de sustitutos corneales humanos de espesor completo una vez resuelto el problema del cultivo del endotelio corneal humano (*Alaminos M et al., 2006*). Sin embargo, aún es necesario: mejorar su consistencia en la medida de lo posible; realizar un estudio pormenorizado de sus propiedades ópticas que incluya refracción, reflexión, absorción y transmisión de la luz visible, fenómenos cuyo conocimiento es imprescindible si queremos elaborar sustitutos corneales transparentes y libres de aberraciones de alto orden que puedan tener aplicación en la práctica clínica; así como evaluar la estabilidad de sus propiedades a largo plazo.

3.3 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS CORNEALES DE ESPESOR PARCIAL Y COMPLETO:

En la actualidad, los problemas planteados por el cultivo del endotelio corneal humana impiden desarrollar equivalentes corneales humanos de espesor completo a partir de células nativas. De hecho, el único equivalente corneal humano de espesor completo elaborado mediante Ingeniería Tisular ha empleado en su elaboración células endoteliales humanas inmortalizadas mediante el virus SV40 (*Griffith M et al., 1999*) (*Reichl S et al, 2004*). La inmortalización celular es un proceso complejo y no bien conocido, que probablemente desemboca en la transformación maligna de las células inmortalizadas en período de tiempo relativamente corto. Esto hace que, la utilización de células genéticamente manipuladas esté altamente restringida a la investigación, no pudiendo emplearse estas células en la práctica clínica. Por tanto, uno de los principales retos actuales de la Ingeniería Tisular de la córnea es el desarrollo y optimización de métodos de cultivo para el endotelio corneal humano.

Una vez solventado el problema del cultivo de las células endoteliales de la córnea humana podremos obtener sustitutos corneales humanos de espesor completo siguiendo la técnica empleada y optimizada para fabricar sustitutos corneales de espesor completo con células de conejo (*Alamimos M et al., 2006*). En concreto se trata de una técnica de cultivo secuencial basada en el empleo de sistemas de cultivo Transwell® con una membrana porosa de 0,4 μm en la base de cada soporte de cultivo. El tamaño de poro elegido evita que las células endoteliales depositadas sobre ella puedan migrar fuera del soporte y, al mismo tiempo, permite el aporte de oxígeno, agua y demás nutrientes a las mismas (*Reichl S y Müller-Goymann CC, 2003*). Esto posibilita, en un primer tiempo, obtener una

monocapa de células endoteliales en la base del soporte y sobre ella fabricar, en un segundo tiempo, el componente estromal del sustituto corneal. En un tercer tiempo, se siembran las células epiteliales sobre el componente estromal y, cuando el epitelio ha alcanzado la estratificación, el constructo es sometido a una técnica de cultivo aire-líquido durante quince días para asegurar la estratificación e inducir la maduración del componente epitelial.

3.4 EVALUACIÓN DE LOS SUSTITUTOS CORNEALES *IN VIVO*:

Una vez elaborado un sustituto corneal de calidad, el siguiente paso es su implante en el receptor. Las características del constructo deben permitir su implante, no desencadenar una reacción inmunológica hiperaguda, aguda, subaguda o crónica de rechazo y hacer posible a medio y largo plazo la integración del sustituto implantado con el tejido corneal circundante sin que se alteren las propiedades de ambos. Este fenómeno de integración debe producirse a nivel de todos los componentes del constructo, epitelio y estroma en nuestro caso.

A) INTEGRACIÓN DE LOS EQUIVALENTES A NIVEL EPITELIAL:

El epitelio corneal, por carecer de células madre y no estar queratinizado, sólo expresa la isoforma 2 de la desmogleína y la desmocolina. Sin embargo, el epitelio límbico, al contener células madre, expresa en los desmosomas de los estratos basales la isoforma 3 de la desmogleína y de la desmocolina. En el presente trabajo hemos utilizado como fuente de células epiteliales epitelio límbico, por eso una de las proteínas evaluadas ha sido la desmogleína 3, puesto que está presente en nuestros cultivos primarios epiteliales y en el epitelio de los constructos elaborados (*Messent AJ et al., 200*). Dicha observación, puede ser útil a la hora de realizar estudios *in vivo*, puesto que, una vez implantado el constructo, la renovación de su epitelio dependerá del limbo esclerocorneal, y sabemos que éste aportará células amplificadoras transitorias tardías que migrarán centrípetamente, mientras que las células que ya han cumplido su ciclo celular sufrirán un fenómeno de descamación. Este fenómeno debe traducirse en la desaparición progresiva de la expresión de desmogleína y desmocolina 3 del epitelio del constructo, manteniéndose sólo la expresión

de la isoforma 2 de ambas cadherinas, a medida que se produce la integración del equivalente corneal con el receptor. Por otro lado, la presencia de un epitelio no queratinizado es una condición necesaria para asegurar la transparencia corneal, y esto se asocia a ausencia de expresión de desmogleína y desmocolina 1. Por tanto, la aparición de esta isoforma en el epitelio de nuestros constructos, a lo largo del seguimiento de los mismos, sería un indicador del posible fallo de los mismos.

La proteína pinin(DRS/memA) es una proteína relacionada a los desmosomas, cuya expresión se asocia a una mayor cohesión intercelular, a una menor capacidad de migración de las células epiteliales y a una menor capacidad de curación de los defectos epiteliales. Esta proteína no forma parte de la estructura del desmosoma pero su presencia refuerza la fijación del desmosoma a los filamentos intermedios del citoesqueleto y hace que éstos formen bucles perpendiculares a la placa densa del desmosoma. Estudios en modelos de lesión epitelial muestran cómo, durante el proceso de curación de las lesiones epiteliales, se produce una disminución en la expresión de esta proteína, lo que permite la migración de las células epiteliales aportadas por el limbo esclerocorneal para reparar dichos defectos (*Shi Y et al., 2000*). Trabajos realizados en tumores epiteliales metastatizantes también han detectado una menor expresión de pinin en algunos de ellos, en concreto se ha asociado a melanomas y a carcinomas renales invasivos. Esto hace, que en la actualidad el gen codificante de la proteína pinin(DRS/memA) sea considerado como un gen supresor de tumor (*Degen WG et al., 1999*) (*Shi Y et al., 2000*). Durante el proceso de generación de un sustituto epitelial las células epiteliales presentan una alta actividad proliferativa y migratoria, por lo que deben poseer una reducida expresión de la proteína pinin. A medida que el epitelio corneal alcanza la estratificación y, sobre todo al lograrse su maduración gracias a la técnica de cultivo aire-líquido, debe producirse, paralelamente a la maduración de los desmosomas, un aumento en la expresión de dicha proteína. De este modo, la expresión de la proteína pinin(DRS/memA) puede servirnos para valorar el grado de madurez del epitelio de nuestros

constructos, a la vez que, una vez lograda la integración del constructo con el receptor, el epitelio del mismo debe ser capaz de disminuir la expresión de la citada proteína para permitir así la movilización de las células amplificadoras transitorias procedentes del limbo esclerocorneal y con ello asegurar la reparación de los defectos epiteliales que puedan surgir en la superficie del constructo.

B) INTEGRACIÓN DE LOS EQUIVALENTES A NIVEL ESTROMAL:

Como se deduce del estudio de pacientes con úlceras corneales neurotróficas, la presencia de un plexo nervioso corneal con terminaciones nerviosas que alcancen el epitelio resulta fundamental para el mantenimiento del trofismo del epitelio corneal (*Beuerman RW y Schimmeelpfennig B, 1980*). Por tanto, para asegurar la supervivencia del componente epitelial, la integración del constructo a nivel estromal debe conllevar la penetración en el mismo de terminaciones nerviosas procedentes del estroma y del epitelio receptor. Este último fenómeno, ya ha sido comprobado en animales con úlceras corneales profundas en las que se han implantado sustitutos estromales fabricados mediante Ingeniería Tisular (*Zhang C et al., 2007*) y en animales sometidos a queratoplastias lamelares anteriores empleando equivalentes corneales de espesor parcial que utilizan sustitutos estromales de colágeno tipo I (*Legali NS et al., 2007*) (*Li F et al., 2003*) (*Liu W et al., 2007*) (*Vrana NE et al., 2007*). Además, se ha podido comprobar que la administración tópica del factor de desarrollo neuronal (*Nerve Growth Factor*) promueve la reinervación corneal en úlceras neurotróficas (*Bonini et al., 2000*) (*Lambiase et al., 1998*) y acelera la reinervación corneal en pacientes sometidos a *LASIK* (*Myung-Jim et al., 2004*), lo que sugiere que podría constituir un arma eficaz para ayudar a la integración de los constructos corneales una vez implantados.

Por otro lado, sabemos que la transparencia de la córnea depende, entre otros factores, de la especial disposición que adoptan las fibrillas de

colágeno y de la ausencia de vasos a nivel del estroma corneal. Una vez implantado el constructo, tanto los queratocitos del componente estromal del constructo como los queratocitos de la zona receptora formarán colágeno tipo I, que permitirá, de un lado mantener la integridad del constructo ante la posible degradación del componente estromal y, de otro lado, consolidar la fijación del implante al receptor posibilitando incluso la retirada de las suturas pasado un tiempo prudencial. De cómo sea este proceso dependerá el mantenimiento de la transparencia del injerto y de la interfase injerto-receptor y por tanto el éxito o fracaso desde el punto de vista visual de la queratoplastia.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se infieren las siguientes conclusiones:

1. En relación con los cultivos de las células epiteliales y queratocitos estromales de la córnea humana en el laboratorio:

Los dos tipos celulares aislados a partir de limbos esclero-corneales humanos en este trabajo, células epiteliales y queratocitos estromales, mostraron una desigual capacidad proliferativa *in vitro*, más elevada en el caso de los queratocitos. No obstante, la capacidad proliferativa de ambas estirpes celulares fue adecuada y permitió la obtención de cultivos celulares primarios. La no utilización de células alimentadoras 3T3 no supuso ningún obstáculo a la proliferación de las células epiteliales corneales humanas.

2. En relación al desarrollo, mediante Ingeniería Tisular, de un modelo parcial de córnea humana utilizando un gel de fibrina humana y agarosa al 0,1%:

Los sustitutos corneales basados en geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% mostraron una adecuada transparencia y consistencia, una correcta adhesión del componente epitelial al estromal, una alta supervivencia celular, una distribución uniforme de los queratocitos estromales incluidos en ellos, así como una carencia de retracción y pérdida de volumen.

3. En relación a la evolución de las características histológicas del epitelio corneal humano generado en el laboratorio en distintos niveles de desarrollo y maduración:

La estratificación del epitelio corneal humano generado mediante Ingeniería Tisular es un fenómeno progresivo que conduce a la formación de un epitelio plano estratificado compuesto por 6-7 capas celulares estructuralmente similares a las del epitelio corneal humano normal. El desarrollo de uniones intercelulares tipo desmosoma a nivel del epitelio corneal humano generado en laboratorio es un proceso secuencial que se asocia al proceso de estratificación epitelial. La técnica de cultivo aire-líquido utilizada en la elaboración de los constructos corneales induce la maduración de los desmosomas epiteliales y logra que la distribución topográfica de los mismos en el seno del epitelio sea análoga a la observada en las córneas humanas nativas.

4. En relación a las características histológicas del estroma corneal humano generado en el laboratorio:

La evaluación microscópica del componente estromal de los constructos corneales humanos basados en geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% mostró una estructura uniforme, con una distribución regular de los queratocitos estromales en su interior, al tiempo que estas células exhibieron una morfología alargada o estrellada similar a la que presentan en la córnea humana normal.

5. En relación al análisis mediante *microarray* de la expresión de genes relacionados con la síntesis de uniones intercelulares tipo mácula adherente en el epitelio corneal humano generado en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular:

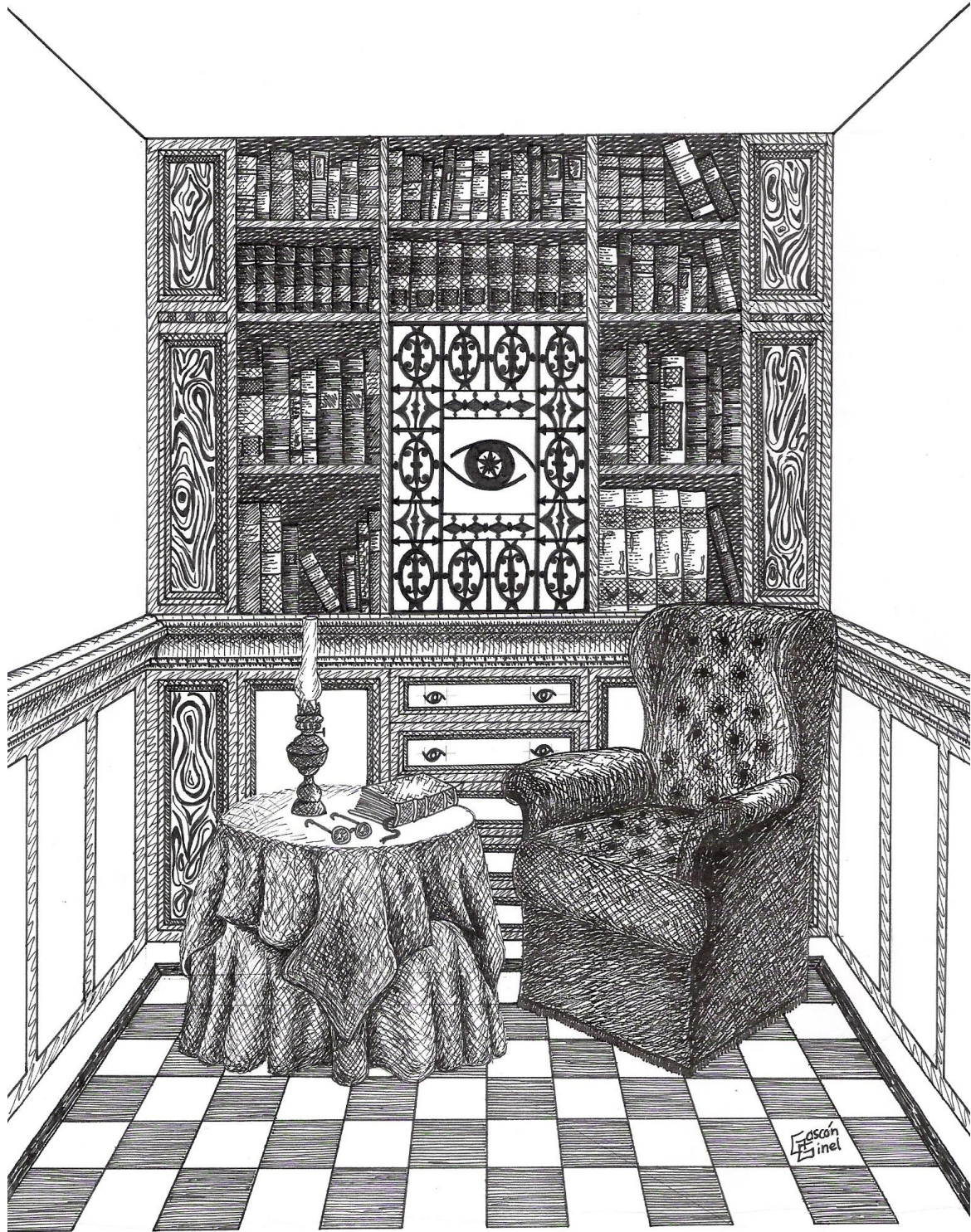
Las técnicas de *microarray* aplicadas a los cultivos primarios de células epiteliales y queratocitos corneales así como a los constructos corneales elaborados mediante Ingeniería Tisular permitieron detectar y cuantificar la expresión de diferentes genes codificantes de proteínas constituyentes de

uniones intercelulares tipo desmosoma, evidenciándose una mayor expresión de los citados genes en los constructos corneales.

6. En relación al análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión secuencial de proteínas relacionadas con la síntesis de uniones intercelulares tipo desmosoma (*macula adhaerens*) en el epitelio corneal humano generado en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular:

Las técnicas de inmunofluorescencia para la detección de desmoplaquina, desmogleína 3 y placoglobina aplicadas a los constructos corneales en diferentes momentos de su desarrollo revelan que la síntesis de dichas proteínas se lleva a cabo de un modo secuencial en correlación con el grado de estratificación epitelial. La técnica de cultivo aire-líquido empleada en esta Tesis Doctoral induce una distribución de dichas proteínas similar a la observada en el epitelio corneal humano nativo.

7. Las técnicas de cultivo celular y de Ingeniería Tisular empleadas en este trabajo y detalladas en la presente Tesis Doctoral han hecho posible la elaboración de un sustituto de espesor parcial, compuesto de epitelio y estroma, de la córnea humana. El estudio, mediante *microarray* e inmunofluorescencia, del epitelio corneal humano así generado pone de manifiesto un fenómeno progresivo de estratificación que se asocia a una síntesis secuencial de proteínas que conforman las uniones intercelulares tipo desmosoma. Estos acontecimientos conducen al desarrollo de un epitelio corneal con una morfología y una distribución de uniones intercelulares tipo desmosoma similares a las observadas en el epitelio corneal humano nativo.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) ADINOLFI, M. AKLE, CA. MCCOLL, I. et al. Expresión of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295(5847): 325-327.
- 2) AKLE, CA. ADINOLFI, M. WELSH, KI. et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2(8254): 1003-1005.
- 3) ALAMINOS, M. SÁNCHEZ-QUEVEDO, MC. MUÑOZ-ÁVILA, JI. et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007; 211(3): 692-698.
- 4) ALAMINOS, M. SÁNCHEZ-QUEVEDO, MC. MUÑOZ-ÁVILA, JI. et al. Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(8): 3311-3317.
- 5) AMANN, J. HOLLEY, GP. LEE, SB. et al. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 584-490.
- 6) ANDERSON, DF. PRABHSAWAT, P. ALFONSO, E. et al. Amniotic membrana transplantation alter the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001; 20(4): 354-361.
- 7) ANG, LP. NAKAMURA, T. INATOMI, T. et al. Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular disease. *Arch Ophthalmol* 2006; 124 (11): 1543-1551.
- 8) ANTONITSIS, P. IOANNIDOU.PAPAGIANNAKI, E. KAIDOGLOU, A. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 56(2): 77-82.
- 9) AQUAVELLA, JV. QIAN, Y. McCORMICK, GJ. et al. Keratoprosthesis: the Dohlman-Doane device. *Am J Ophthalmol* 2005; 140(6): 1032-1038.
- 10) ATALA, A. Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 2000; 14(1): 49-57.
- 11) AUFDERHEIDE, AC. ATHANASIOU, KA. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 2005; 11 (7-8): 1095-1104.
- 12) AUGER, FA. LÓPEZ VALLE, CA. GUIGNARD, R. et al. Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro Cell Dev* 1995; 31(6): 432-439.
- 13) AZUARA-BLANCO, A. PILLAI, CT. DUA, HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(4): 399-402.

- 14) BACOU, F. EL ANDALOUSI, RB. DAUSSIN, PA. et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004; 13(2): 103-111.
- 15) BANAS, A. TERATANI, T. YAMAMOTO, Y. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46(1): 219-228.
- 16) BARRAQUER, JL. Lamellar keratoplasty. *Ann Ophthalmol* 1972; 4(6): 437-469.
- 17) BELL, E. Deterministic models of tissue engineering. *J Cell Eng* 1995; 1: 28-34.
- 18) BEUERMAN, RW. PEDROZA, L. Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech* 1996; 33(4): 329-335.
- 19) BEUERMAN, RW. SCHIMMEELPFENNIG, B. Sensory denervation of the cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 1980; 69(1): 196-201.
- 20) BEZWADA, P. CLARK, LA. SCHNEIDER, S. Intrinsic cytotoxic effects of fluoroquinolones on human corneal keratocytes and endothelial cells. *Curr Med Res Opin* 2008; 24(2): 419-424.
- 21) BLENCKE, BA. HAGAN, P. BROMER, H. et al. Study on the use of glass ceramics in osteo-odonto-keratoplasty. *Ophthalmologica* 1978; 176(2): 105-112.
- 22) BONANNO, JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Progr Retin Eye Res* 2003; 22(1): 69-94.
- 23) BORCHERDING, MS. BLACIK, LJ. SITTING, RA. et al. Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. *Exp Eye Res* 1975; 21(1): 59-70.
- 24) BORDERIE, VM. SABOLIC, V. TOUZEAU, O. et al. Screening human donor corneas during organ culture for the presence of guttae. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(3): 272-276.
- 25) BORENE, ML. BAROCAS, VH. HUBEL, A. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(2): 274-283.
- 26) BROWN, AL. Lime burns of the eye: Use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects. *Arch Ophthalmol* 1941; 26: 522-525.
- 27) BUCK, RC. Hemidesmosomes of normal and regenerating mouse corneal epithelium. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982; 41(1-2): 1-16.
- 28) CAIAZZA, S. FALCINELLI, G. PINTUCCI, S. Exceptional case of bone resorption in an osteo-odontokeratoprosthesis. A scanning electron microscopy and X ray microanalysis. *Cornea* 1990; 9(1): 23-27.
- 29) CAIAZZA, S. FANIZZA, C. MAZZIOTTI, I. Light and scanning electron microscopy evaluation of the Dacron felt as the haptic part of an

- improved keratoprosthesis. An *in vitro* and *in vivo* study. *Clin Mater* 1988; 3: 33-40.
- 30) CAMPO, Z. del. GRIS, O. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals d'Oftalmología* 2002; 10(3): 128-141.
- 31) CAMPOS MARTÍN, A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina.* Madrid 2004.
- 32) CARDONA, H. Keratoproshtesis with a pastic fiber meshwork supporting plate. Report of an experimental and comparative histologic study. *Am J Ophthalmol* 1967; 64(2): 228-233.
- 33) CARON, MJ. WILSON, R. Review of the risk of HIV infection through corneal transplantation in the United States. *J Am Optom Assoc* 1994; 65(3): 173-178,
- 34) CASTORO, JA. BETTELHEIM, AA. BETTELHEIM, FA. Water concentration gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29(6): 963-968.
- 35) CASTROVIEJO, R. CARDONA, H. DEVOE, AG. The present status of prosthokeratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1969: 68(4): 613-625.
- 36) CHANG, JE. BASU, SK. LEE, VHL. Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 2000; 17(6): 670-676.
- 37) CHEN, HJ. PIRES, TRF. TSENG, SCG. et al. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(8): 826-833.
- 38) CHEN, J. LI, Q. XU, J. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artificial Organs* 2005; 29(2): 104-113.
- 39) CHEN, WYW. MUI, MM, KAO, WW. et al. Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K-12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1994; 13(10): 765-778.
- 40) CHIRILA, TV. Modern artificial corneas; the use of porous polymers. *Trens Polym Sci* 1994; 2: 296-300.
- 41) CHO, BJ. DJALILIAN, AR. OBRITSCH, WD. et al. Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane fail to transdifferentiate into corneal epithelial-type cells. *Cornea* 1999; 18(2): 216-224.
- 42) CHOI, YS. KIM, JY. WEE, WR. et al. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998; 17(4): 389-395.
- 43) CHUNG, EH. BUKUSOGLU, G. ZIESKE, JD. Localization of corneal epithelial stem cells in the developing rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(7): 2199-2206.

- 44) COLLINSON, JM. MORRIS, L. REID, AI. et al. Clonal analysis of patterns of growth, stem cell activity, and cell movement during the development and maintenance of the murine corneal epithelium. *Dev Dyn* 2002; 224(4): 432-440.
- 45) COSTER, DJ. WILLIAMS, KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2005; 140(6): 1112-1122.
- 46) COTSARELIS, G. CHENG, SZ. DONG, G. 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): 201-209.
- 47) COWING, P. MATTEY, D. GARROD, D. Distribution of desmosomal components in the tissues of vertebrates studied by fluorescent antibody staining. *J Cell Sci* 1984; 66: 119-132.
- 48) CROSSON, CE. Cellular changes following epithelial abrasion. En: Beuerman RW, Crosson CE, Kaufman HE (eds.): *Healing Processes in the Cornea, Vol 1, Advances in Applied Biotechnology Series*. The Woodlands, TX, Portfolio Publishing, 1989.
- 49) DAVANGER, M. EVENSEN, A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; 229(5286): 560-561.
- 50) DAVISON, PF. GALBAVY, EJ. Connective tissue remodelling in corneal and scleral wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(10): 1478-1484.
- 51) DAVIES, N. AKHTAR, S. TURNER, HC. et al. Chloride channel gene expression in the rabbit cornea. *Mol Vis* 2004; 10: 1028-1037.
- 52) DEGEN, WG. AGTERBOS, MA. MUYRERS, JP. et al. MemA/DRS, a putative mediator of multiprotein complexes, is overexpressed in the metastasizing human melanoma cell lines BLM and MV3. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1444(4): 384-394.
- 53) DE ROTTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940; 23: 522-525.
- 54) DE UGARTE, DA. ALFONSO, Z. ZUK, PA. et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; 89(2-3): 267-270.
- 55) DOHLMAN, CH. HARISSI-DAGHER, M. KHAN, BF. et al. Introduction to the use of the Boston Keratoprosthesis. *Expert Rev Ophthalmol* 2006; 1(1): 41-48.
- 56) DOILLON, CJ. WATSKY, MA. HAKIM, M. et al. A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int J Artif Organs* 2003; 26(8): 764-773.
- 57) DUA, HS. SAINI, JS. AZUARA-BLANCO, A. et al. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000; 48(2): 83-92.

- 58) DUAN, D. KLENKLER, BJ. SHEARDOWN, H. Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(1): 59-72.
- 59) DUAN, X. SHEARDOWN, H. Incorporation of cell-adhesion peptides into collagen scaffolds promotes corneal epithelial stratification. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007; 18(6): 701-711.
- 60) DUAN, X. SHEARDOWN, H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials* 2006; 27(26): 4608-4617.
- 61) DUTOT, M. POUZAUD, F. LAROSCHE, I. Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(7): 2812-2819.
- 62) EBATO, B. FRIEND, J. THOFT, RA. Comparison of central and peripheral human epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28(9): 1450-1456.
- 63) EBERTZ, SL. MCGANN, LE. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology* 2004; 49(2): 169-280.
- 64) ECKARDT, C. A new temporary keratoprosthesis for pars plana vitrectomy. *Retina* 1987; 7(1): 34-37.
- 65) FALCINELLI, G. FALSINI, B. TALONI, M. et al. Modified osteo-odonto-keratoprosthesis for treatment of corneal blindness: long-term anatomical and functional outcomes in 181 cases. *Arch Ophthalmol* 2005; 123(10): 1319-1329.
- 66) FALCINELLI, G. BAROGI, G. TALONI, M. et al. Osteodontokeratoprosthesis: present experience and future prospects. *Refract Corneal Surg* 1993; 9: 193-194.
- 67) FALKE, GF. ATALA, A. Reconstrucción de tejidos y órganos usando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98 (2): 103-115.
- 68) FISCHBARG, J. MAURICE, DM. An update on corneal hydration control. *Exp Eye Res* 2004; 78(3):537-541.
- 69) FORRESTER, JV. DICK, AD. McMENAMIN, PG. et al. *The Eye. Basic sciences in practice*. 2nd Edition. BW. Saunders 2002.
- 70) FREEGARD, TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 1997; 11(4): 465-471.
- 71) FUJISHIMA, H. SHIMAZAKI, J. SHINOZAKI, N. et al. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29(5): 428-431.
- 72) GALVIN, S. LOOMIS, C. MANABE, M. et al. The major pathways of keratinocyte differentiation as defined by keratin expression: an overview. *Adv Dermatol* 1989; 4: 277-299.

- 73) GASSET, AR. DOHLMAN, CH. The tensile strength of corneal wounds. *Arch Ophthalmol* 1968; 79(5): 595-602.
- 74) GENESER, F. *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2000.
- 75) GERMAIN, L. CARRIER, P. AUGER, FA. et al. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Preg Retin Eye Res* 2000; 19(5): 497-527.
- 76) GEROSKI, DH. HADLEY, A. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr Eye Res* 1992; 11(1): 61-72.
- 77) GIPSON, IK. SPURR-MICHAUD, SJ. TISDALE, AS. Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28(2): 212-220.
- 78) GIPSON, IK. Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. En: Smolin G, Thoft RA (eds). *The cornea*. Ed. Little Brown, Boston. 1977: 3-24.
- 79) GOESSLER, UR. BURGET, P. BIEBACK, K. et al. Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *Int J Mol Med* 2008; 21(3): 271-279.
- 80) GORDON, RA. DONZIS, PB. Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol* 1985; 103(6): 785-789.
- 81) GRIFFITH, LG. NAUGHTON, G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295(5557): 1009-1014.
- 82) GRIFFITH, M. OSBORNE, R. MUNGER, R. et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999; 286(5447): 2169-2172.
- 83) HAFEZI, F. MROCHEN, M. FANKHAUSER, F. et al. Anterior lamellar keratoplasty with a microkeratome: a method for managing complications after refractive surgery. *J Refract Surg* 2003; 19(1): 52-57.
- 84) HANNA, C. BICKNELL, DS. O'BRIEN, JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961; 65: 695-698.
- 85) HARRISON, DA. HODGE, DO. BOURNE, WM. Outcome of corneal grafting with donor tissue from eyes with primary choroidal melanomas. A retrospective cohort comparison. *Arch Ophthalmol* 1995; 113(6): 753-756.
- 86) HASSAN, SS. WILHELMUS, KR. DAHL, P. et al. Infectious disease risk factors of corneal graft donors. *Arch Ophthalmol* 2008; 126(2): 235-239.
- 87) HAYASHIDA, Y. NISHIDA, K. YAMATO, M. et al. Transplantation of tissue-engineered epithelial cell sheets after excimer laser photorefractive keratectomy reduces postoperative corneal haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(2): 552-557.

- 88)HECKMANN, JG. LANG, CJ. PETRUCH, F. et al. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63(3): 388-390.
- 89)HERRERA, L. MARTÍNEZ, C. CARRASCO, H. et al. Cornea as a tissue reservoir of *Tripanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2007; 100(6): 1395-1399.
- 90)HICKS, CR. CRAWFORD, GJ. LOU, X. et al. Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor trade mark: device, preliminary outcomes and complications. *Eye* 2003; 17(3): 385-392.
- 91)HICKS, CR. CRAWFORD, GJ. DART, JK. et al. AlphaCor: Clinical outcomes. *Cornea* 2006; 25(9): 1034-1042.
- 92)HICOK, KC. THOMAS, T. GORI, F. et al. Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* 1998; 13(2): 205-217.
- 93)HILLE, K. HILLE, A. RUPRECHT, KW. Medium term results in keratoprotheses with biocompatible and biological haptic. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244(6): 696-704.
- 94)HODSON, S. Cultivating a cure for blindness. *Nature* 1997; 387(6632): 449.
- 95)HODSON, S. MILLER, F. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. *J Physiol* 1976; 263(3): 563-577.
- 96)HOFT, RH. PFLUGFELDER, SC. FOSTER, RK. et al. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. *Cornea* 1997; 16(2): 132-137.
- 97)HOGAN, RN. BROWN, P. HECK, E. et al. Risk of prion disease transmission from ocular donor tissue transplantation. *Cornea* 1999; 18(1): 2-11.
- 98)HOLLEY, GP. SUGARMAN, PE. PUROHIT, AR. et al. Endothelial cell density is significantly increased in the far peripheral (limbal) region of the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; (ARVO abstracts)#3176
- 99)HOLLICK, EJ. WATSON, SL. DART, JKG. et al. Legeais BioKpro III keratoprosthesis implantation: long term results in seven patients. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(9): 1146-1151.
- 100)HORNOF, M. TOROPAINEN, E. URTTI, A. Cell cultures models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60(2): 207-225.
- 101)HOUFF, SA. BURTON, RC. WILSON, RW. et al. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *N Engl J Med* 1979; 300(11): 603-604.
- 102)HUHTALA, A. POHJONEN, T. SALMINEN, L. et al. In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from

- various ocular tissues: direct contact studies. *J Biomed Mater Res* 2007; 83(2): 407-413.
- 103) HUTAK, CM. KAVANAGH, ME. REDDY, IK. Comparative development of SIRC rabbit corneal cells grown on polycarbonate and polyester-based filters. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15(2): 133-138.
- 104) HYMAN, L. WITTPEN, J. YANG, C. Indications and techniques of penetrating keratoplasty. *Cornea* 1992; 11(6); 573-576.
- 105) IBUSUKI, S. HALBESMA, GJ. RANDOLPH, MA. et al. Photochemically cross-linked collagen gels as three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng* 2007; 13(8): 1995-2001.
- 106) JOHNSON, DH. BOURNE, WM. CAMPBELL, RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 1982; 100(12): 1942-1947.
- 107) JOYCE, NC. MATKIN, ED. NEUFELD, AH. Corneal endothelial wound closure in vitro. Effects of EGF and/or indomethacin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30(7): 1548-1559.
- 108) JOYCE, NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progr Retin Eye Res* 2003; 22(3): 359-389.
- 109) KATZ, M. The human eye as an optical system. Tasman W., Jaeger EA. editors. *Duane's clinical Ophthalmology*, vol 1, Philadelphia 1989.
- 110) KAWASHIMA, M. KAWAKITA, T. SATAKE, Y. et al. Phenotypic study alter cultivated limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(10): 1337-1344.
- 111) KAWAZU, K. SHIONO, H. TANIOKA, H. et al. Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports. *Curr Eye Res* 1998; 17(2): 125-131.
- 112) KEE, C. HWANG, JM. Amniotic membrane graft for late-onset glaucoma filtering leaks. *Am J Ophthalmol* 2002; 133(6): 834-835.
- 113) KENNEDY, RH. HOGAN, RN. BROWN, P. et al. Eye banking and screening for Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(5): 721-726.
- 114) KENYON, KR. TSENG, SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96(5): 709-722; discussion 722-723.
- 115) KHADEMHOSEINI, A. LANGER, R. BORENSTEIN, J. et al. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (8):2480-2487.
- 116) KINOSHITA, S. ADACHI, W. SOTOZONO, C. et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 639-673.
- 117) KINOSHITA, S. KIORPES, TC. FRIEND, J. et al. Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(5): 577-581.

- 118) KIM, MK. HEO, JW. LEE, JL. et al. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after in vivo transplantation. *Curr Eye Res* 2005; 30(8): 639-646.
- 119) KIM, JC. TSENG, SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14(5): 473-484.
- 120) KOIZUMI, N. SAKAMOTO, Y. OKUMURA, N. et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(10): 4519-4526.
- 121) KOIZUMI, N. NISHIDA, K. AMANO, S. et al. Progress in the development of tissue engineering of the cornea in Japan. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2007; 111(7): 493-503.
- 122) KOIZUMI, N. INATOMI, T. SOTOZONO, C. et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation on ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108(9): 1569-1574.
- 123) KOMAI, Y. USHIKI, T. The three dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(8): 2244-2258.
- 124) KRUSE, FE. ROHRSCHEIDER, K. VÖLKER, HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106(8): 1504-1510; discussion 1511.
- 125) KRUSE, FE. CHEN, JJY. TSAI, RJ. et al. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(9): 1903-1913.
- 126) KURPAKUS, MA. STOCK, EL. JONES, JCR. The role of basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 1992; 150(2): 243-255.
- 127) KUROSAWA, H. Methods for Inducing Embryoid Body Formation: In Vitro Differentiation System of Embryonic Stem Cells. *J Biosci Bioeng* 2007; 103 (5): 389-398.
- 128) LAI, JY. CHEN, KH. HSU, WM. et al. Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(10): 1441-1448.
- 129) LAMPARTER, J. DICK, HB. KRUMMENAUER, F. Clinical benefit, complication patterns and cost effectiveness of laser in situ keratomileusis (LASIK) in moderate myopia: results of independent meta analyses on clinical outcome and postoperative complication profiles. *Eur J Med Res* 2005; 10(9): 402-409.
- 130) LANGER, R. VACANTI, JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260 (5110): 920-926.
- 131) LARSEN, CP. ELWOOD, ET. ALEXANDER, DZ. et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts by blockade of the CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381(6581): 434-438.

- 132) LATKANY, R. TSUK, A. SHEU, MS. et al. Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelialization. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1): 29-37.
- 133) LEGEASIS, JM. RENARD, G. A second generation of artificial cornea (Biokpro II). *Biomaterials* 1999; 19(16): 1517-1522.
- 134) LEGEASIS, JM. RENARD, G. PAREL, KM. et al. Expanded fluorocarbon polymer for keratoprosthesis. Cellular ingrowth and transparency. *Exp Eye Res* 1994; 58(1): 41-51.
- 135) LEI, Z. YONGDA, L. JUN, M. et al. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2007; 31(9): 916-923.
- 136) LEIBOWITZ, HM. TRINKAUS-RANDALL, V. TSUK, A. et al. Progress in the development of a synthetic cornea. *Prog Retin Eye Res* 1994; 13: 605-621.
- 137) LI, F. CARLSSON, D. LOHMANN, C. et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26): 15346-15351.
- 138) LIMAT, A. FRENCH, LE. BLAL, L. et al. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(2): 207-214.
- 139) LINNOLA, RJ. HAPPONEN, RP. ANDERSSON, OH. et al. Titanium and bioactive glass-ceramic coated titanium as materials for keratoprosthesis. *Exp Res Eye* 1996; 63(4): 471-478.
- 140) LIU, CS. SCISCIO, A. SMITH, GT. et al. Indications and technique of modern osteo-odonto-keratoprosthesis (OOKP) surgery. *Eye News* 1998; 4: 17-22.
- 141) LIU, W. MERRETT, K. GRIFFITH, M. et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials* 2008; 29(9): 1147-1158.
- 142) LIU, Y. GAN, L. CARLSSON, DJ. et al. A Simple, Cross-linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(5): 1869-1875.
- 143) LLAMES, SG. DEL RÍO, M. LARCHER, F. et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77(3): 350-355.
- 144) MA, DH. YAO, JY. YEH, LK. et al. In vitro antiangiogenic activity in ex vivo expanded human limbo-corneal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8): 2586-2595.
- 145) MA, DH. SEE, LC. LIAU, SB. et al. Amniotic membrane graft for primary pterygium closure: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(9): 973-978.

- 146) MAJO, F. BARRANDON, Y. OTHENIN-GIRARD, P. et al. Corneal epithelial diseases related to limbal stem cell deficiency. *J Fr Ophthalmol* 2006; 29(9): 1060-1069.
- 147) MARCHI, V. RICCI, R. PECORELLA, I. et al. Osteo-odonto-keratoprosthesis. Description of surgical technique with results in 85 patients. *Cornea* 1994; 13(2): 125-130.
- 148) MARSHALL, GE. KONSTAS, AG. LEE, WR. Inmunogold fine structural localization of extracellular matrix compounds in aged human cornea: I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991; 229(2): 157-163.
- 149) MARSHALL, GE. KONSTAS, AG. LEE, WR. Inmunogold fine structural localization of extracellular matrix compounds in aged human cornea: II. Types V-VI collagen and laminin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991; 229(2): 164-171.
- 150) MATSUDA, M. SAWA, M. EDELHAUSER, HF. et al. Cellular migration and morphology in endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26(4): 443-449.
- 151) MAURICE, DM. The cornea and sclera. *The Eye*. 3rd. ed. Vol 1b. Davson H (ed.). 1984.
- 152) MAURICE, DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136(2): 263-286.
- 153) MAWAS, MJ. L'innervation de la cornée humaine. *Bull Soc Ophthalmol Paris* 1951; 2: 162.
- 154) McCANNA, DJ. HARRINGTON, KL. DRIOT, JY. et al. Use of a human corneal epithelial cell line for screening the safety of contact lens care solutions in vitro. *Eye Contact Lens* 2008; 34(1): 6-12.
- 155) McGEORGE, AJ. VOTE, BJ. ELLIOT, DA. et al. Papillary adenocarcinoma of the iris transmitted by corneal transplantation. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(10): 1379-1383.
- 156) McLAUGHLIN, BJ. CALDWELL, RD. SASAKI, Y. Freeze fracture quantitative comparison of rabbit epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res* 1985; 4(9): 951-961.
- 157) MEANA, A. IGLESIAS, J. DEL RÍO, M. et al. Large surface of cultures human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24(7): 621-630.
- 158) MELLES, GR. LANDER, F. VAN DOOREN, BT. et al. Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incisión. *Ophthalmology* 2000; 107(10): 1850-1856; discussion 1857.
- 159) MELLES, GR. LANDER, F. RIETVELD, FJ. et al. A new surgical technique for deep anterior lamellar keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(3): 327-333.

- 160) MERGLER, S. PLEYER, U. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26(4): 359-378.
- 161) MESSENT, AJ. BLISSETT, MJ. SMITH, GL. et al. Expression of a single pair of desmosomal glycoproteins renders the corneal epithelium unique amongst stratified epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(1): 8-15.
- 162) MESSMER, EM. Hypopyon after amniotic membrane transplantation. *Ophthalmology* 2001; 108(10): 1714-1715.
- 163) MINAMI, Y. SUGIHARA, H. OONO, S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(7): 2316-2324.
- 164) MIRANVILLE, A. HEESCHEN, C. SENGÈS, C. et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3): 349-355.
- 165) MISHIMA, S. GASSETT, A. KLYCE, SD. BAUM JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol* 1966; 5(3): 264-576.
- 166) MIYASHITA, H. SHIMMURA, S. KOBAYASHI, H. et al. Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76(1): 56-63.
- 167) MOLL, R. FRANKE, WW. SCHILLER, DL. et al. The catalog of human cytokeratins, patterns of expression in normal epithelia, tumors and culture cells. *Cell* 1982; 31(1): 11-24.
- 168) MOYER, PD. KAUFMAN, AH. ZHANG, Z. et al. Conjunctival epithelial cells can resurface denuded cornea, but do not transdifferentiate to express cornea-specific keratin 12 following removal of limbal epithelium in mouse. *Differentiation* 1996; 60(1): 31-38.
- 169) MUÑOZ-ÁVILA, JI. Utilidad de la Ingeniería Tisular en el tratamiento de las enfermedades corneales. Tesis Doctoral. 2006.
- 170) MURUBE, J. CHEN ZHUO. Anatomía y Fisiología. En: Murube del Castillo, J (ed.). *Ojo Seco-Dry Eye*. Tecimedia Editorial. 1997: 15-36.
- 171) NATHAN, S. DAS DE, S. THAMBYAH, A. et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* 2003; 9(4): 733-744.
- 172) NAUGHTON, G. Skin: The first tissue engineered products. The Advanced Tissue Sciences story. *Sci Am* 1999; 280(4): 84-85.
- 173) NEREM, RM. SAMBANIS, A. Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1: 3-13.
- 174) NISHIDA, K. KAMATO, M. HAYASHIDA, Y. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosa epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351(12): 1187-1196.

- 175) NISHIDA, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22(7 Suppl): S28-34.
- 176) ORWIN, EJ. BORENE, ML. HUBEL, A. Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J Biomech Eng* 2003; 125(4): 439-444.
- 177) ORWIN, EJ. HUBEL, A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng* 2000; 6(4): 307-319.
- 178) OUSLEY, PJ. TERRY, MA. Objective screening methods for prior refractive surgery in donor tissue. *Cornea* 2002; 21(2): 181-188.
- 179) PARENTEAU, N. Skin: The first tissue engineered products. The Organogenesis history. *Sci Am* 1999; 280 (4):83-84.
- 180) PATEL, NP. KIM, T. RAPUANO, CJ. et al. Indications for and outcomes of repeat penetrating keratoplasty, 1989-1995. *Ophthalmology* 2000; 107(4): 719-724.
- 181) PEI, YF. RHODIN, JA. Electron microscopic study of the development of the mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol* 1971; 10(11): 811-825.
- 182) PINTUCCI, S. PINTUCCI, F. CECCONI, M. et al. New Dacron tissue colonisable keratoprosthesis: clinical experience. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(9): 825-829.
- 183) PINTUCCI, S. PINTUCCI, F. CAIAZZA, S. et al. The Dacron felt colonizable keratoprosthesis: after 15 years. *Eur J Ophthalmol* 1996; 6(2): 125-130.
- 184) PIRES, RTF. CHOKSHI, A. Amniotic membrane transplantation or limbal conjunctival autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5-fluorouracil in glaucoma surgeries. *Cornea* 2000; 19(3): 284-287.
- 185) PIRES, RTF. TSENG, SCG, PRABHASAWAT, P. et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999; 117(10): 1291-1297.
- 186) POLLARD, SM. AYE, NN. SIMMONDS, EM. Scanning electron microscopic appearance of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol* 1976; 83(6): 470-477.
- 187) PORTER, RA. BROWN, RA. EASTWOOD, M. et al. Ultrastructural changes during contraction of collagen lattices by ocular fibroblasts. *Wound Repair Regen* 1998; 6(2): 157-166.
- 188) PRABHASAWAT, P. TESAVIBUL, N. KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects with and without stromal thinning and perforation. *British J Ophthalmol* 2001; 85(12): 1455-1463.
- 189) PRABHASAWAT, P. BARTON, K. BURKETT, G. et al. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary

- closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997; 104(6): 974-985.
- 190) PRÓSPER, F. GAVIRA, JJ. HERREROS, J. et al. Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. *An Sist Sanit Navar* 2006; 29(2 Suppl): S219-S234.
- 191) PUANGSRICHARERN, V. TSENG, SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cells deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102(10): 1476-1485.
- 192) RAMÍREZ, MA. PERICUESTA, E. FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R. et al. Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies. *Int J Dev Biol* 2007; 51 (5): 397-407.
- 193) RAVELOJAONA, V. ROBERT, AM. ROBERT, L. Collagen biosynthesis in cell culture: Comparison of corneal keratocytes and skin fibroblast Effect of rhamnose-rich oligo- and polysacchases. *Pathol Biol* 2008 Jan 3.
- 194) RAYMOND, GM. JUMBLATT, MM. BARTELS, SP. et al. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(4): 474-479.
- 195) REICHL, S. BEDNARZ, J. MÜLLER-GOYMANN, CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(4): 560-565.
- 196) REICHL, S. MÜLLER-GOYMANN, CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* 2003; 250(1): 191-201.
- 197) RIGAL-SASTOURNE, JC. TXIER, JM. RENARD, JM. et al. Corneal burns and matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9): the effects of human amniotic membrane transplantation. *J Fr Ophtalmol* 2002; 25(7): 685-693.
- 198) RHEINWALL, JG. GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6(3): 331-343.
- 199) RHEINWALL, JG. GREEN, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 1975; 6(3): 317-330.
- 200) RICHARD, NR. ANDERSON, JA. WEISS, JL. et al. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr Eye Res* 1991; 10(8): 739-749.
- 201) ROBERT, PY. ADENIS, JP. PLEYER, U. How "safe" is corneal transplantation? A contribution on the risk of HSV-transmission due to corneal transplantation. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222(11): 870-873.
- 202) RODRÍGUEZ-ARES, MT. TOURIÑO, R. Clasificación de deficiencias del limbo. Benítez del Castillo et al. *Superficie ocular*. Mac Line S.L. 2004: 29-36.

- 203) ROWE, TF. KING, LA. MacDONALD, PC. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176(4): 915-921.
- 204) ROZSA, AJ. BEUERMAN, RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 1982; 14(2): 105-120.
- 205) SALAME, N. VIEL, JF. ARVEUX, P. et al., Cancer transmission through corneal transplantation. *Cornea* 2001; 20(7): 680-682.
- 206) SÁNCHEZ-QUEVEDO, MC. ALAMINOS, M. CAPITÁN, LM. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* 2007; 22(6): 631-640.
- 207) SANDEMAN, SR. FARAGHER, RGA. ALLEN, MCA. et al. Novel materials to enhance keratoprosthesis integration. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(6): 640-644.
- 208) SCHÄFER, S. KOCH, PJ. FRANKE, WW. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 1994; 211(2): 391-399.
- 209) SCHOTVELD, JH. RAIJMAKERS, AJ. HENRY, Y. et al. Donor-to-host transmitted Candida endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Cornea* 2005; 24(7): 887-889.
- 210) SCHNEIDER, AI. MAIER-REIF, K. GRAEVE, T. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; 35(9): 515-526.
- 211) SHI, Y. OUYANG, P. SUGRUE, S. Characterization of the gene encoding Pinin/DRS/memA and evidence for its potential tumor suppressor function. *Oncogene* 2000; 19(2): 289-297.
- 212) SHI, Y. TABESH, M. SUGRUE, S. Role of Cell-Adhesion-Associated Protein, Pinin (DRS/memA), in Corneal Epithelial Migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(6): 1337-1345.
- 213) SHIMAZAKI, J. KOSAKA, K. SHIMMURA, S. et al. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2003; 110(1): 119-124.
- 214) SHIMAZAKI, J. SHINOZAKI, N. TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(3): 235-240.
- 215) SHIMMURA, S. SHIMAZAKI, J. OHASHI, Y. et al. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20(4): 408-413.
- 216) SKALAK, R. FOX, F. *Tissue Engineering*. New York: Liss (ed). 1988.

- 217) SOLTER, D. GEARHART, J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283(5407): 1468-1470.
- 218) SORSBY, A. HAYTHORNE, J. REED, H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1947; 31(7): 409-418.
- 219) STOIBER, J. GRABNER, G. Clinical management of severe ocular surface disease. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222(7): 533-551.
- 220) STRAMPELLI, B. Keratoprosthesis with osteodontal tissue. *Am J Ophthalmol* 1963; 89: 1029-39.
- 221) SUMIDE, T. NISHIDA, K. YAMATO, M. et al. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 2006; 20(2): 392-394.
- 222) SUZUKI, K. TANAKA, T. ENOKI, M. et al. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(9): 2495-2500.
- 223) TALBOT, M. CARRIER, P. GIASSON, CJ. et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006; 12: 65-75.
- 224) TAMURA, Y. KONOMI, H. SAWADA, H. et al. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(9): 2636-2644.
- 225) TEGTMEYER, S. PAPANTONIOU, I. MÜLLER-GOYMANN, CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 51(2): 119-125.
- 226) TEIXEIRA, AI. NEALEY, PF. MURPHY, CJ. Responses of human keratocytes to micro and nanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71(3): 369-376.
- 227) TEMPRANO, JA. Advantages of auto-graft tibial keratoprosthesis (KPT). *An Inst Barraquer (Barc.)* 2002; 31:146.
- 228) TERRY, MA. OUSLEY, PJ. Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures. The first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. *Ophthalmology* 2003; 110(4): 755-764; discussion 764.
- 229) THOFT, RA. WILEY, LA. SUNDARRAJ, N. The multipotential cells of the limbus. *Eye* 1989; 3(2): 109-113.
- 230) THOFT, RA. FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of the corneal epithelium maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(10): 1442-1443.
- 231) TORBET, J. MALBOUYRES, M. BUILLES, N. et al. Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials* 2007; 28(29): 4268-4276.

- 232) TOROPAINEN, E. RANTA, VP. TALVITIE, A. et al. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(12): 2942-2948.
- 233) TRELFOED, JD. TRELFOED-SAUDER, M. The amnion in surgery, past and present. *J Am Obstet Gynecol* 1979; 134(7): 833-845.
- 234) TSENG, SCG. LI, DQ. TAN, DTH. et al. Suppression of Transforming Growth Factor isoforms, TGF- β receptor II, and myofibroblast differentiation in culture human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999(3); 179: 325-335.
- 235) TSENG, SCG. PRABHSAWAT, P. BARTON, K. et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116(4): 431-441.
- 236) TSENG, SCG. Concept and application of limbal Stem cells. *Eye* 1989; 3(2): 141-157.
- 237) TSUK, A. TRINKAUS-RANDALL, V. LEIBOWITZ, HM. Advances in polyvinyl alcohol hydrogel keratoprotheses: protection against ultraviolet light and fabrication by a molding process. *J Biomed Mater Res* 1997; 34(3): 299-304.
- 238) VIDART, JA. JIMENO, JM. En: Vidart JA, Jimeno García JM (eds.). *Tratado de Obstetricia Dexeus. Tomo III: Pregrado Obstetricia y Ginecología*. Ed. Luzán 5, Madrid. 1988: 93-118.
- 239) VRANA, NE. BUILLES, N. KOCAK, H. et al. EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007; 18(12): 1527-1545.
- 240) WOO, HM. KIM, MS. KWEON, OK. et al. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(3): 345-349.
- 241) WU, Y. CHEN, L. SCOTT, PG. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25(10): 2648-2659.
- 242) YAGHOUTI, F. NOURI, M. ABAD, JC. et al. Keratoprothesis: preoperative prognostic categories. *Cornea* 2001; 20(1): 19-23.
- 243) ZHANG, C. NIE, X. HU, D. et al. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. *Cell Tissue Res* 2007; 329(2): 249-257.
- 244) ZHANG, L. DENG, M. KAO, CW. et al. MEK kinase 1 regulates c-Jun phosphorylation in the control of corneal morphogenesis. *Mol Vis* 2003; 9: 584-593.
- 245) ZHOU, S. CHEN, J. FENG, L. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. *Chin Med J* 2003; 116(5): 788-790.

- 246) ZIESKE, JD. Corneal development associated with eyelid opening. *Int J Dev Biol* 2004; 48(8-9): 903-911.
- 247) ZIESKE, JD. MASON, VS. WASSON, ME. et al. Basement membrane assembly and differentiation of cultures corneal cells: importance of culture environmente and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 1994; 214:621-233.
- 248) ZIESKE, JD. WASSON, ME. Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *J Cell Sci* 1993; 106: 145-152.
- 249) ZUK, PA. ZHU, M. ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-7295.