



**Universidad de Granada**  
*Facultad de Medicina*  
*Departamento de Histología*

**Generation of human artificial corneas by Tissue Engineering to be used as Advanced Therapies**

**Generación de córneas humanas artificiales por Ingeniería Tisular para su utilización como medicamentos de Terapias Avanzadas**

***TESIS DOCTORAL***  
***Doctorado Europeo***

**Miguel González Andrades**  
*Licenciado en Medicina*  
*Máster en Ingeniería Tisular*

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Miguel González Andrades  
D.L.: GR 1138-2012  
ISBN: 978-84-695-1052-0





**Universidad de Granada**  
*Facultad de Medicina*  
*Departamento de Histología*

# **Generación de córneas humanas artificiales por Ingeniería Tisular para su utilización como medicamentos de Terapias Avanzadas**

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina  
y Máster en Ingeniería Tisular  
**Miguel González Andrades**  
para aspirar al título de Doctor  
con la mención *Doctor europeus*

***Fdo.: Miguel González Andrades***





**Universidad de Granada**  
*Facultad de Medicina*  
*Departamento de Histología*

## **Generación de córneas humanas artificiales por Ingeniería Tisular para su utilización como medicamentos de Terapias Avanzadas**

Los doctores Antonio Campos Muñoz, Catedrático de Universidad y perteneciente al Departamento de Histología de la Universidad de Granada, Miguel Alaminos Mingorance, Profesor Titular de Universidad y perteneciente al Departamento de Histología de la Universidad de Granada, y Natividad Cuende Melero, directora ejecutiva de la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas.

Certifican:

Que el trabajo de investigación que recoge esta Memoria de Tesis Doctoral, titulada "**Generación de córneas humanas artificiales por Ingeniería Tisular para su utilización como medicamentos de Terapias Avanzadas**", presentada por el Licenciado en Medicina y Máster en Ingeniería Tisular, D. Miguel González Andrades, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

**Vº Bº El Director de Tesis**

**Vº Bº El Director de Tesis**

**Vº Bº La Directora de Tesis**

**Fdo. Dr. Antonio  
Campos Muñoz**

*Catedrático de Universidad  
Departamento de Histología  
Universidad de Granada*

**Fdo. Dr. Miguel  
Alaminos Mingorance**

*Titular de Universidad  
Departamento de Histología  
Universidad de Granada*

**Fdo. Dr. Natividad Cuende  
Melero**

*Directora ejecutiva  
de la Iniciativa Andaluza  
en Terapias Avanzadas*



***A mis abuelos.***





***“Se ha dicho tantas veces que el problema de España es un problema de cultura. Urge, en efecto, si queremos incorporarnos a los pueblos civilizados, cultivar intensamente los yermos de nuestra tierra y de nuestro cerebro, salvando para la prosperidad y enaltecimiento patrios todos los ríos que se pierden en el mar y todos los talentos que se pierden en la ignorancia”.***

*Santiago Ramón y Cajal*



*“Resignémonos a marchar humildemente  
detrás de los sabios, para marchar  
algún día en su compañía”.*

Ramón y Cajal





Después de años de trabajo, esfuerzo y constancia, ha sido posible la realización de esta Tesis Doctoral, la cual, no sólo ha sido fruto del *autor* sino de todos aquellos que han estado a mi lado siempre y a los cuales he de expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi gran amigo, maestro, compañero de experimentos, viajes y confidencias, director de esta tesis, el Dr. Miguel Alaminos, artífice del camino que he seguido y ejemplo humano a todos los niveles. Él fue quien me impulsó a abrir mi mente, a salir de esta encrucijada de caminos, desde “el chorreón molar” pasando por las “bolinhas de heladu”. Un compañero inseparable cuya sola presencia llena a los que tenemos la suerte de conocerlo.

Al Dr. Antonio Campos, mi querido tutor, gran amigo e inmejorable director de esta tesis. Sin ser aún conscientes todos los que le rodeamos, del privilegio que es tener a nuestro lado apoyándonos siempre al maestro de maestros, quiero darle las gracias por ser un estímulo constante en nuestras vidas, no sólo a nivel científico, sino también a nivel cultural y sobre todo, a nivel personal.

A la Dra. Natividad Cuende, directora de esta tesis, la excelencia de la profesionalidad. Todos aquellos que tenemos la fortuna de trabajar a su lado, le debemos a ella la fuerza, la intensidad y la constancia que caracterizan nuestro día a día. Gracias por convertir sueños de probetas y papeles, en una realidad que casi palpamos.

A la Dra. Ingrid Garzón, perenne alumna y amiga, compañera de avatares científicos y personales, gracias por tu inestimable ayuda siempre, sin dudarlo, gracias de corazón; y a la persona que me la presentó, la Dra. María del Carmen Sánchez Quevedo, la madre de nuestra pequeña gran familia científica, y a todos aquellos que forman parte de la misma, gracias por haberme dejado aprender de vosotros y hacerme partícipe de ella.

A María del Mar, Ana, Juancho y al resto de amigos que trabajan en el departamento de Óptica. Gracias por vuestra colaboración desinteresada, estando siempre dispuestos a confiar y trabajar con desconocidos como yo.

A todos los miembros del Departamento de Histología, sin excepción alguna; gracias por haberme hecho sentir como un miembro más, por vuestro cariño y comprensión. Gracias por dejar siempre las puertas abiertas a alumnos cuya curiosidad iba más allá de los apuntes.

A mis amigos y compañeros de trabajo, a los adjuntos del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Cecilio y a los *resistentes*, en especial a los que me arropáis siempre: Daniel, José Luis, Nacho, Jose, Carmen, J.Enrique, Juan y Salva. Gracias a todos por vuestra ayuda inestimable, por vuestro compañerismo y amistad.

A mi familia, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todas mi decisiones, por la confianza depositada en mí sin resquicio a la duda. Gracias por enseñarme a mover mis piezas en el juego más difícil de todos, la vida. Por marcarme el camino con vuestro ejemplo sincero. Gracias también a los que aún sin serlo, sois parte de ella; Antonio, gracias por ser un hermano más.

Gracias a todos aquellos que me enseñaron y fraguaron la persona en la que me he convertido hoy, a los que me entendieron y respetaron, permitiéndome ser tal como soy, a mis amigos, desde la infancia y los Maristas hasta la Facultad. A mis profesores, ya estuvieran entre canastas o entre columnas, a todos vosotros, gracias.

Y por último, y no menos importante, a mi mejor amiga y compañera, a quien le debo prácticamente todo y a la vez nada, a quien siempre me ha apoyado y me ha animado a seguir hacia delante a pesar de las dificultades, a quien me sujeta y me ancla al mundo real para, al mismo tiempo, hacerme volar y soñar. A tí, con quien quiero compartir el resto de mis días, gracias por apoyarme en esta labor tan ardua, gracias Victoria.







*“Domine ut videam (Señor, que vea)”.*

*Juan 9, 1 – 40.*



RESUMEN / ABSTRACT



*Corneal diseases are one of the most important causes of visual impairment in the world. Thus, many patients affected by this pathology finally need a corneal transplant. This treatment implies two major problems: the lack of donors and the possibility of graft rejection. Therefore, the generation of a corneal substitute in the laboratory has emerged as a necessity. In order to accomplish this challenge, tissue engineering appears as a promising science whose aim is to generate artificial tissues and organs that can replace damaged tissues and organs in the human body. Moreover, construction of artificial organs and tissues by tissue engineering is strongly dependent on the availability of viable cells. For that reason, the viability and the physiological status of cells kept in culture must be evaluated before the cells can be used for clinical purposes. Regarding tissue engineering of the cornea, different approaches have been attempted. In this thesis, two different models of artificial corneas are developed together with the characterization of corneal cell cultures and the establishment of a clinical translational approach.*

*Both models are based on the combination of corneal cells and scaffolds: one based on fibrin-agarose scaffolds and the other one based on acellular xenografts. Corneal keratocytes were obtained from sclerocorneal limbus donated by human cadavers after digesting corneal stroma using collagenase. Epithelial corneal cells were obtained applying an explants culture technique. Because of the difficulty of culturing human corneal endothelial cells, the characterization of endothelial cells in culture was carried out using rabbit corneal endothelial cells, without using them to generate the tissue engineering corneal constructs. The human artificial cornea based on fibrin-agarose scaffold was developed seeding these cells into an artificial matrix generated*

*using a mixture of agarose VII and fibrin obtained from human donors. The acellular xenograft model was created applying a decellularization process to pig corneas, based on NaCl. After obtaining an acellular corneal stroma from pig corneas, the human keratocytes were seeded over it. Once both models were developed, histological and optical analyses were carried out.*

*In both models, a well-developed stroma was observed based on the presence of collagen and proteoglycans. The keratocytes proliferated and spread, migrating across the corneal matrix. Some immunohistochemical assays were performed, showing the differentiation and characteristic expression of corneal proteins. Optical analyses revealed the high transparency level that both models presented, observing that UV-light was mostly absorbed by the corneal substitutes. Regarding corneal endothelial cells, a remarkable decrease in the K/Na ratio from the fourth to the fifth subculture was found, suggesting that cells of the first four subcultures would be better candidates for tissue engineering, together with the necessity of achieve cell confluence to maintain the endothelial cell pattern. All these results suggest that corneal substitutes made by tissue engineering show similar characteristics to human corneas. Thus, artificial corneas could represent a promising treatment for many corneal diseases which do not have a proper and adequate established treatment.*





*“A los hombres les encanta maravillarse.  
Esto es la semilla de la ciencia”.*

R.W. Emerson



*INDICE*





# ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>		<b>29</b>
<b>1.1. LA CÓRNEA</b>		31
1.1.1. Concepto		31
1.1.2. Etimología		32
1.1.3. Generalidades anatómicas		33
1.1.3.1. <i>Inervación corneal</i>		33
1.1.3.2. <i>Vascularización y nutrición corneal</i>		36
1.1.4. Histología		37
1.1.4.1. <i>Epitelio corneal</i>		38
1.1.4.2. <i>Capa de Bowman</i>		39
1.1.4.3. <i>Estroma</i>		41
1.1.4.4. <i>Membrana de Descemet</i>		42
1.1.4.5. <i>Endotelio corneal</i>		43
1.1.5. El limbo esclerocorneal		44
<b>1.2. FUNCIONES DE LA CÓRNEA</b>		46
1.2.1. Barrera frente al medio externo		46
1.2.2. El dioptrio corneal. Mecanismos de transparencia		47
1.2.2.1. <i>El dioptrio corneal</i>		47
1.2.2.2. <i>Teoría de la transparencia</i>		47
1.2.2.3. <i>Cristalinas corneales expresadas en queratocitos</i>		49
1.2.2.4. <i>Opacificación corneal, dispersión celular de la luz y la expresión corneal de cristalinas</i>		50
1.2.2.5. <i>Desarrollo de la transparencia y la expresión de cristalinas corneales</i>		51
<b>1.3. PATOLOGÍA CORNEAL Y SU TRATAMIENTO</b>		53
1.3.1. Epidemiología de la patología corneal. La ceguera corneal		53
1.3.2. Aproximaciones terapéuticas a la patología corneal severa		55
1.3.2.1. <i>Queratoplastias</i>		55
1.3.2.2. <i>Membrana amniótica y recubrimiento conjuntival</i>		57
1.3.2.3. <i>Queratoprótesis</i>		59
1.3.2.4. <i>El limbo esclerocorneal como fuente de tratamientos regenerativos corneales</i>		61
<b>1.4. GENERACIÓN DE CÓRNEAS ARTIFICIALES: EL IMPACTO DE LA INGENIERÍA TISULAR</b>		65
1.4.1. Ingeniería Tisular mediante la elaboración de constructos		68
1.4.2. Ingeniería Tisular mediante la descelularización de órganos nativos		74
1.4.3. Ingeniería Tisular ontogénica		79

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

83

<b>2.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	85
---------------------------------------	----

**CAPÍTULO 3. RELACIÓN DE ARTÍCULOS Y TRABAJOS CIENTÍFICOS 87**

3.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES CORNEALES A PARTIR DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL HUMANO	91
3.2. EVALUATION OF THE VIABILITY OF CULTURED CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS BY QUANTITATIVE ELECTRON PROBE X-RAY MICROANALYSIS	97
3.3. VOLUMETRIC AND IONIC REGULATION DURING THE IN VITRO DEVELOPMENT OF A CORNEAL ENDOTHELIAL BARRIER	105
3.4. SEQUENTIAL DEVELOPMENT OF INTERCELLULAR JUNCTIONS IN BIOENGINEERED HUMAN CORNEAS	117
3.5. UV ABSORBANCE OF A BIOENGINEERED CORNEAL STROMA SUBSTITUTE IN THE 240-400 NM RANGE	125
3.6. GENERATION OF BIOENGINEERED CORNEAS WITH DECELLULARIZED XENOGRAFTS AND HUMAN KERATOCYTES	129
3.7. PROTOCOLO DE ENSAYO CLÍNICO PARA LA UTILIZACIÓN DE CAH-FA EN HUMANOS	137

**CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN 151**

4.1. ESTUDIO COMPARADO DE LOS DOS MODELOS DE CórNEA HUMANA GENERADOS POR INGENIERÍA TISULAR	153
4.2. TRASLACIÓN A LA CLÍNICA. MODELO DE TRASLACIÓN DEL CAH-FA COMO MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS	159
4.2.1. Análisis de riesgos	163
4.2.1.1. <i>Idoneidad de los materiales utilizados</i>	163
4.2.1.2. <i>Idoneidad del producto elaborado</i>	166
4.2.2. Calidad y manufactura	167
4.2.2.1. <i>Materiales y productos a utilizar</i>	167
4.2.2.2. <i>Proceso para la generación de córneas por Ingeniería Tisular</i>	169
4.2.3. Requisitos clínicos para el implante de los constructos corneales	173
4.2.3.1. <i>Consideraciones preoperatorias</i>	173
4.2.3.2. <i>Consideraciones quirúrgicas del implante del constructo corneal</i>	176

**CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES 181****CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS 191**

6.1. BIBLIOGRAFÍA	193
6.2. ANEXOS	205
6.2.1. Listado de abreviaturas	205
6.2.2. Listado de figuras y tablas	207





*“La ciencia es la verdadera escuela moral;  
ella enseña al hombre el amor y el respeto a la  
verdad, sin el cual toda esperanza es quimérica”.*

P. Berthelot

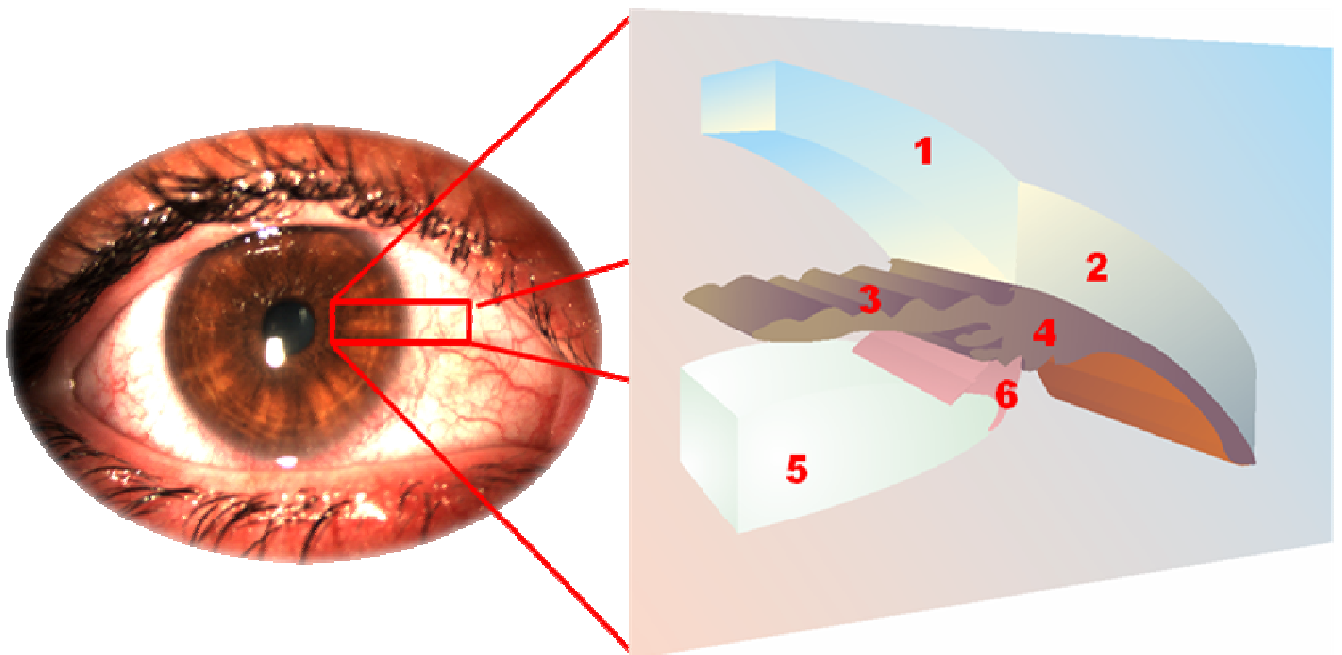




## 1. LA CÓRNEA

### 1.1. CONCEPTO:

La córnea (FIGURA 1) es un órgano transparente de gran resistencia que se halla en el polo anterior del globo ocular, a través del cual se puede observar el iris, y cuyas funciones más importantes son conformar una barrera que protege al resto de estructuras oculares de la agresión externa y constituir el principal dioptrio del sistema visual humano.



**Figura 1:** Esquema anatómico del globo ocular a nivel anterior, indicándose las distintas partes que lo componen (1: córnea, 2: esclera, 3: iris, 4: cuerpo ciliar, 5: cristalino, 6: zónula de Zinn). Elaboración propia.



## 1.2. ETIMOLOGÍA:

En el s. I d.C., el Imperio Romano usaba términos griegos para designar las partes del ojo, sin distinguir terminológicamente entre córnea y esclera. Así, Cornelio Celso, autor latino de dicha época, expresa: “El ojo tiene dos túnicas en lo más externo de ellas, la más exterior la llaman los griegos keratoeidēs (κερατοειδής), ... la que está por debajo, coroides”. Con ello, Celso usa “túnica” como sinónimo de membrana, debido a un calco del griego χιτών (khitōn). Así, en griego κερατοειδής χιτών significaría “membrana córnea”, ya que κερατοειδής es un compuesto que significa “similar al cuerno”. A finales del s. I d.C., el autor griego Rufo de Efeso distingue terminológicamente la córnea de la esclera: “La primera de las dos membranas del ojo tiene dos nombres: κερατοειδής la parte del medio y que llega hasta el iris, porque se parece a los cuernos pulidos, y se llama blanca todo el resto” (*De corporis humani appellationibus*). (Cid Ledesma et al., 2007).

Los documentos conservados hasta hoy indican que no se tradujo ni se calcó la denominación griega de córnea al latín hasta la Edad Media. El tratado en latín medieval donde se documenta por primera vez dicha diferenciación está muy influenciado por la medicina árabe, pudiendo haber llegado la palabra griega al latín medieval no desde el griego directamente, sino a través del árabe, donde la córnea se llama “*al-tabaqa al-qarniyya*”, es decir, “túnica del cuerno”. La primera referencia en la Edad Media donde se documenta el uso de la palabra córnea es en la *Anatomia Porci*, fechada entre 1110 y 1120, donde se afirma que “*tunica quae est iuxta eam (coiunctivam) dicitur cornea*”, es decir, “la membrana que está en contacto con la conjuntiva se denomina córnea” (Cid Ledesma et al., 2007).

### 1.3. GENERALIDADES ANATÓMICAS:

La córnea no es un tejido homogéneo en sus medidas. Su diámetro horizontal mide aproximadamente 11-12 mm, midiendo el diámetro vertical 10-11 mm (American Academy of Ophthalmology., 2005). La región central de la córnea es prácticamente esférica, la cual mide 4 mm de diámetro aproximadamente, siendo su espesor menor (0,49-0,56 mm) que en la periferia (0,7-0,9 mm), ya que la superficie posterior de la córnea tiene una curvatura más pronunciada que la superficie anterior (Gordon and Donzis, 1985). La córnea se aplana en la periferia, no siendo el grado de aplanamiento simétrico ya que nasal y superiormente es mayor que en la región temporal e inferior (American Academy of Ophthalmology., 2006).

#### 1.3.1. Inervación corneal:

La córnea es el tejido con mayor densidad de terminaciones nerviosas en el cuerpo humano, siendo 100 veces mayor la sensibilidad de la córnea en contraposición a la conjuntiva. Entre los neurotransmisores que encontramos en la córnea destacan la acetilcolina, catecolaminas, sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, neuropéptido Y, péptidos intestinales, galanina y encefalina-metionina (American Academy of Ophthalmology., 2006). La inervación sensitiva, procedente de la rama oftálmica (Va) del Nervio Trigémico, llega a la córnea a partir de los nervios ciliares largos que forma un plexo nervioso en el estroma corneal.

Una media de  $71,3 \pm 14,3$  haces nerviosos principales entran uniformemente espaciados en el limbo esclerocorneal, entrando en la córnea a una distancia media de

293  $\pm$  106 micras de la superficie ocular, perdiendo las vainas de mielina a 1-2 mm del limbo esclerocorneal (FIGURA 2). Cada haz nervioso en el estroma da origen a sucesivas ramificaciones conformando el plexo medio estromal. Éste continúa ramificándose hacia la superficie, agrupándose dichas ramificaciones estromales en unas 20 fibras nerviosas llamadas “correas epiteliales” (*epithelial leashes*) cuando llegan al epitelio corneal. Estas se anastomosan ampliamente en la región central y paracentral corneal para formar un plexo denso y continuo a nivel subepitelial, el llamado plexo subbasal (Marfurt *et al.*, 2010).

El plexo subbasal forma un conjunto en vórtice (FIGURA 2), al converger las fibras curvilíneas subepiteliales en una suave espiral imaginaria en sentido horario, inferonasal al ápex corneal. Las terminaciones intraepiteliales se originan a partir de ramas de los nervios subepiteliales, terminando en todas las capas de células epiteliales. La densidad de puntos por donde los nervios penetran en la membrana de Bowman es mayor en la periferia que en la región central. Las terminaciones nerviosas de las capas de células escamosas y alares, son diversas en morfología y longitud, teniendo las capas suprabasales del epitelio corneal a nivel central aproximadamente 605,8 terminaciones/mm<sup>2</sup> (Marfurt *et al.*, 2010, Al-Aqaba *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Esquema representativo de la inervación corneal. Se observan los nervios periféricos estromales (marrón oscuro) penetrando a través del limbo esclerocorneal (línea discontinua). En un plano superior aparece el plexo subbasal (azul), convergiendo en un punto a modo de vórtice (asterisco) en el cuadrante inferonasal. Modificado de (Marfurt et al., 2010).

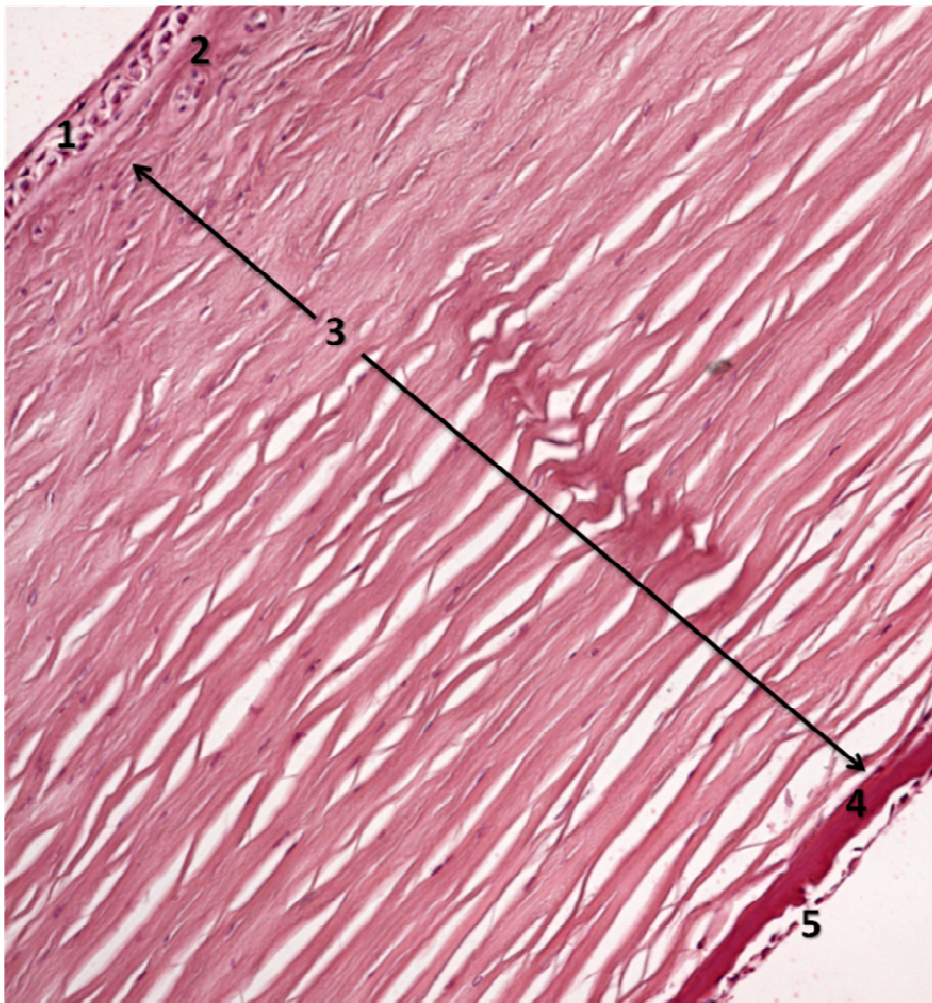
### 1.3.2. Vascularización y nutrición corneal:

La córnea recibe el oxígeno a partir de la película lagrimal, la vascularización palpebral y el humor acuoso. Para todas las células corneales, la glucosa es el sustrato metabólico básico. Así, la glucosa que reciben las células endoteliales proviene del humor acuoso, las cuales, a través de transportadores de membrana, proveen al estroma de glucosa. Dicha glucosa llega al epitelio mediante difusión pasiva a través del estroma. La película lagrimal y los vasos límbicos aportan el 10% de la glucosa metabolizada por la córnea (American Academy of Ophthalmology., 2005).

La córnea es un órgano avascular. Sin embargo, ante determinadas agresiones, se produce una neovascularización corneal. La neovascularización superficial de la córnea se compone de un tejido de granulación que separa el epitelio de la membrana de Bowman, conformando bucles vasculares que emigran por extensión directa. La vascularización intersticial se compone de vasos que están orientados a modo de “brocha” por la orientación de las laminillas de colágeno en el estroma. Existe también una neovascularización profunda que penetra entre el estroma y la membrana de Descemet. Todo esto lleva a una alteración en la función óptica, un aumento en la antigenicidad corneal y un aumento en la deposición de lípidos a nivel corneal (Cogan, 1949).

#### 1.4. HISTOLOGÍA:

La córnea humana se conforma a partir de 5 capas histológicas (FIGURA 3). La capa más superficial es el epitelio, debajo del cual se halla el estroma corneal, separadas ambas por la capa de Bowman. La capa más interna es el endotelio, encontrándose la membrana de Descemet entre ésta y el estroma.



**Figura 3:** Corte histológico de la córnea humana teñido con hematoxilina-eosina (1: Epitelio; 2: Capa de Bowman; 3: Estroma; 4: Membrana de Descemet; 5: Endotelio).

#### 1.4.1. Epitelio corneal:

La capa más superficial de la córnea se caracteriza por ser un epitelio plano estratificado no queratinizado, que constituye el 5% aproximadamente del espesor corneal (50-56  $\mu\text{m}$ ). Se compone de 5-7 estratos en la región central, aumentando a 8-10 en la periferia. Conforme nos alejamos de la región basal y nos aproximamos a la película lagrimal, el número de organelas disminuye intracelularmente, adoptando la célula una forma cada vez más aplanada. Así, se distinguen varios tipos de células epiteliales según el estrato celular donde se encuentren (FIGURA 4) (Krachmer *et al.*, 2005).

El estrato celular más superficial está formado por las células apicales, las cuales presentan, en su membrana apical, pliegues y microvellosidades que entran en contacto directo con la superficie lagrimal, donde se descaman en el proceso de renovación celular epitelial. En la capa intermedia del epitelio se encuentran las células alares, las cuales poseen prolongaciones en forma de alas, de ahí su nombre. El estrato epitelial más interno está constituido por las células basales o columnares; estas proceden de las células amplificadoras transitorias que migran desde el limbo esclerocorneal, siendo éstas las únicas células epiteliales que poseen actividad mitótica y dan origen al resto de células epiteliales, permitiendo así la renovación del epitelio corneal (Lavker *et al.*, 1991, Yanoff and Fine, 2002).

Las células epiteliales establecen entre sí múltiples uniones intercelulares conformando una estrecha barrera frente al medio externo. Entre estas encontramos desmosomas, más abundantes en las capas superficiales; uniones gap o comunicantes, más abundantes en las capas basales; y uniones estrechas o zónula *occludens*, más

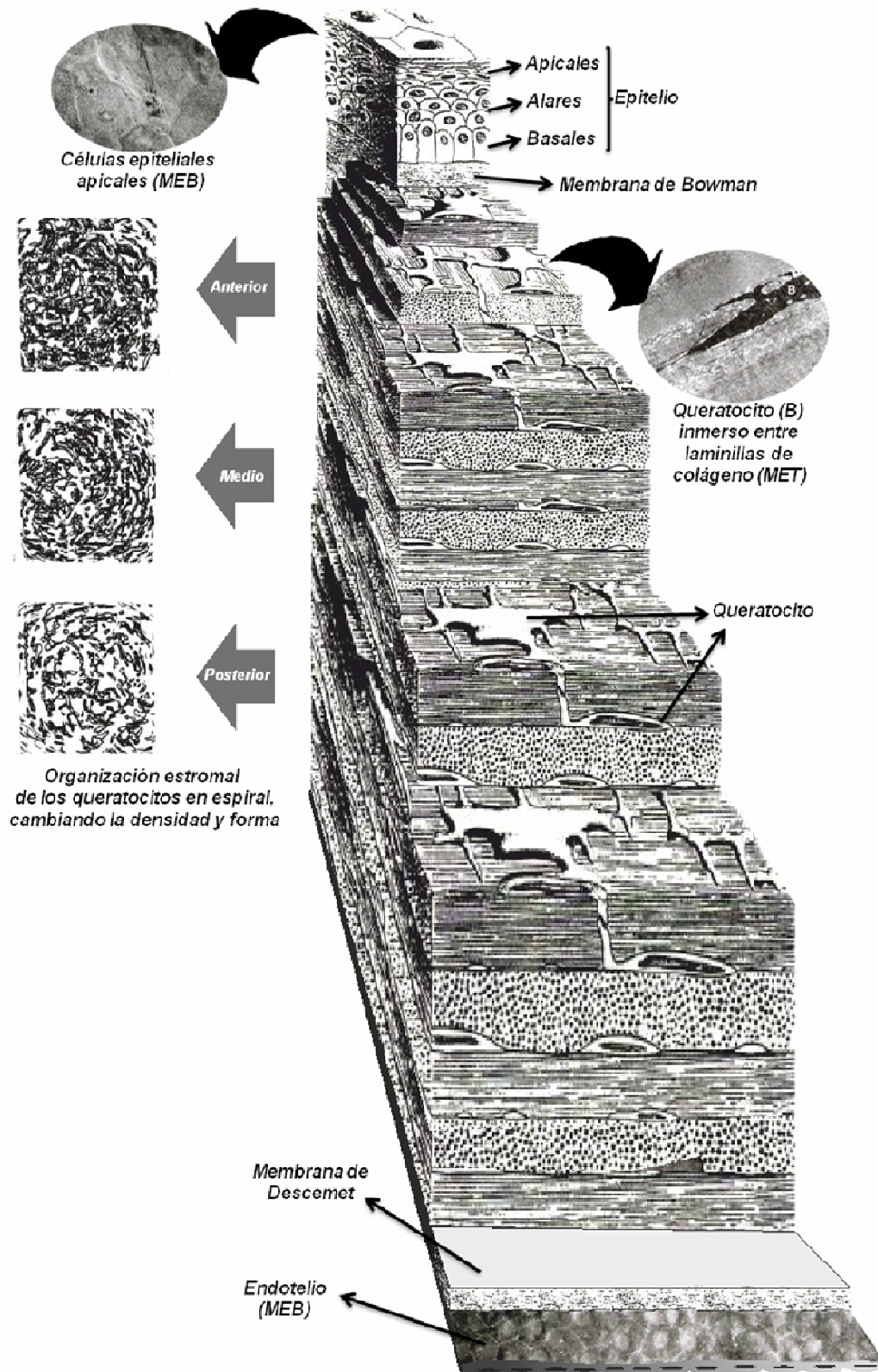
abundantes en las capas superficiales (Gonzalez-Andrades *et al.*, 2009). Entre las células epiteliales corneales podemos encontrar otro tipo de células, sobre todo a nivel periférico, como son histiocitos, macrófagos, linfocitos, melanocitos y células de Langerhans (American Academy of Ophthalmology., 2005).

El epitelio corneal produce la membrana basal sobre la cual se ancla, gracias a los hemidesmosomas sintetizados por las células basales (FIGURA 5). La membrana basal mide 75 nm de espesor, aproximadamente, dividiéndose en dos según la apariencia observada en la microscopía electrónica: *lámina lúcida* anterior (25 nm) y *lámina densa* posterior (50 nm). Su composición se basa en distintas proteínas entre las que encontramos: colágeno tipo IV y laminina (Krachmer *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Capa de Bowman:**

Justo inferior a la membrana basal epitelial se halla una capa acelular de 8 a 14  $\mu\text{m}$  de espesor, compuesta por fibras de colágeno entrelazadas entre sí sin orden alguno. Considerada una modificación del estroma corneal, cualquier daño infligido sobre la capa de Bowman generará un fenómeno de cicatrización (Lagali *et al.*, 2009).





**Figura 4:** Gráfico representativo de la estructura corneal (MET y MEB: microscopía electrónica de transmisión y barrido, respectivamente). Modificado de (Leibowitz and Waring, 1998) y (Muller et al., 1995).

### 1.4.3. Estroma:

El estroma corneal constituye el 90% del grosor corneal humano. En su mayor parte, está formado por fibras de colágeno de tipo I y V, entrelazándose entre estas colágeno tipo VI. Estas se agrupan entre sí formando laminillas que se disponen de una forma orientada, oblicuamente en el tercio anterior estromal y paralelamente en los dos tercios más profundos, estando separadas unas de otras por una distancia fija, en gran parte gracias a los proteoglicanos dermatán y queratán sulfato. Esta disposición específicamente orientada confieren a la córnea su transparencia y su resistencia (Ruberti and Zieske, 2008, Quantock and Young, 2008).

Entre las láminillas de colágeno se insertan los queratocitos, los cuales ocupan alrededor de un 5% del volumen estromal. Su densidad no es homogénea ya que decrece conforme nos acercamos a la región más posterior del estroma (de 1058 células/mm<sup>2</sup> en la región anterior, a 771 células/mm<sup>2</sup> en la región posterior), presentando además una disposición en espiral de anterior a posterior a través de las láminas de colágeno (Muller *et al.*, 1995). Sintetizan gran parte de los elementos estructurales del estroma corneal y su morfología plana y estrellada les confiere una gran superficie, creando puentes de comunicación a través de uniones gap y fenestraciones que presentan en su membrana, creando interconexiones entre ellos mismos a través de las lamelas de colágeno (FIGURA 4) (Leibowitz and Waring, 1998).

#### 1.4.4. Membrana de Descemet:

La membrana basal del endotelio corneal y sintetizada por éste, la membrana de Descemet, se establece como la estructura que separa el endotelio del estroma corneal. Su espesor aumenta con la edad, pasando de 3-4  $\mu\text{m}$  en el nacimiento a 10-12  $\mu\text{m}$  en el adulto. Está compuesta fundamentalmente de colágeno tipo IV y tipo VIII, laminina y fibronectina, pudiendo diferenciarse dos regiones, una anterior estriada desarrollada en la vida fetal y otra posterior no estriada desarrollada a lo largo de la vida (Beuerman and Pedroza, 1996).

#### 1.4.5. Endotelio corneal:

El endotelio corneal es un epitelio plano simple de 5  $\mu\text{m}$  de espesor aproximadamente, que está en contacto con el humor acuoso. Existen alrededor de 3000-3500 células/ $\text{mm}^2$  cuya disposición en mosaico es característica, al poseer la célula del endotelio corneal una morfología hexagonal (FIGURA 4) (Beuerman and Pedroza, 1996, Srinivas, 2010). Su metabolismo y funcionalidad es máxima en relación con el intercambio de iones y líquidos mediante mecanismos de transporte activo entre el estroma corneal y la cámara anterior donde se halla el humor acuoso. Así se asegura la transparencia corneal, evitando la edematización del estroma (Srinivas, 2010, Mergler and Pleyer, 2007).

El número de células endoteliales disminuye progresivamente con la edad, ya que la actividad mitótica de las células endoteliales es mínima. Dicha pérdida celular se compensa en cierta medida gracias a un fenómeno de polimegatismo y pleomorfismo

mediante el cual, la célula aumento de tamaño y cambia su forma (Lass *et al.*, 2005, Krachmer *et al.*, 2005, Schroeter and Rieck, 2009). Algunos autores han demostrado que el endotelio corneal tiene cierta capacidad regenerativa. Así, se ha descrito la capacidad mitótica de éste en individuos jóvenes, junto con la posibilidad de la regeneración del mismo a partir de células del limbo y de células endoteliales adultas manipuladas genéticamente (Joyce and Harris, 2010, Engler *et al.*, 2009).

### 1.5. EL LIMBO ESCLEROCORNEAL:

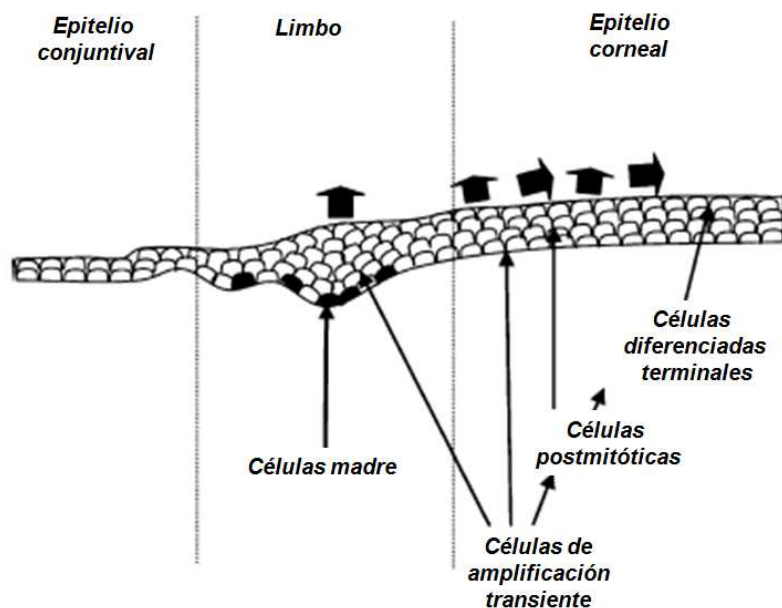
El limbo esclerocorneal es una estructura que juega un papel fundamental en la fisiología del polo anterior del globo ocular. Se enmarca como la zona de transición entre la córnea y la esclera, distinguiéndose como una línea grisácea de unos 2 mm de anchura entre ambas. Entre las funciones del limbo esclerocorneal destacan la nutrición de la córnea periférica, actuar como reservorio de células madre del epitelio corneal y, por tanto, permitir la regeneración y mantenimiento de este epitelio; además participa en la inmunovigilancia y en respuestas de hipersensibilidad, así como en la función de barrera que impide que el tejido conjuntival alcance la córnea (Li *et al.*, 2007).

Las células madre epiteliales limbares (LESC, del inglés, "*limbal epithelial stem cells*") se cree que residen en la capa basal del epitelio limbal, el cual se encuentra entre el epitelio corneal y conjuntival, siendo de un espesor algo mayor que el epitelio corneal. El estroma corneal pierde aquí su transparencia, y sus láminas pierden su disposición ordenada, las fibras de colágeno aumentan de tamaño y su disposición es más parecida a las de la esclera (Chen *et al.*, 2004).

Las LESC no están distribuidas uniformemente por el limbo humano, ya que se concentran a nivel superior e inferior del limbo esclerocorneal. El epitelio basal del limbo conforma una serie de ondulaciones llamadas empalizadas de Vogt. Dichas ondulaciones emiten proyecciones epiteliales, llamadas crestas epiteliales, en el estroma subyacente donde las arterias episclerales proporcionan el suministro de sangre a estas, crítica en el suministro de nutrientes y oxígeno. Este microambiente, representado por las empalizadas y las criptas, genera un nicho ambiental especializado para el mantenimiento de un estado indiferenciado celular, para

controlar su proliferación y para guiar el compromiso de su progenie a determinados linajes celulares (Notara and Daniels, 2008).

Las LESC tienen una capacidad ilimitada para la auto-renovación y exhiben una baja actividad mitótica. Una vez que comienza la diferenciación de estas, es irreversible y se produce por amplificación transiente. Las células de amplificación transiente son capaces de realizar un número finito de divisiones celulares, migrando centripetamente, pudiéndose encontrar así en el epitelio basal del limbo y la córnea periférica. Las células de amplificación transiente se diferencian en células postmitóticas del epitelio corneal suprabasal, las cuales darán lugar a las células diferenciadas terminales del epitelio corneal superficial (Vemuganti *et al.*, 2009).



**Figura 5:** Gráfico representativo de la diferenciación de las LESC. Modificado de (Notara and Daniels, 2008).

## 2. FUNCIONES DE LA CÓRNEA:

### 2.1. BARRERA FRENTE AL MEDIO EXTERNO:

La córnea establece una barrera de protección frente al medio externo al separar físicamente éste de las estructuras más internas del globo ocular. Gracias a la gran cohesión de las distintas capas histológicas que componen la córnea, y la íntima relación que establece ésta con los anejos oculares, principalmente la conjuntiva, el aparato lagrimal y los párpados, se establece un eficaz sistema protector y de soporte para el globo ocular (Krachmer *et al.*, 2005).

## **2.2. EL DIOPTRIO CORNEAL. MECANISMOS DE TRANSPARENCIA:**

### **2.2.1. El dioptrio corneal**

La córnea permite la refracción y la transmisión de la luz a su través gracias a la gran regularidad y uniformidad de su arquitectura, asociándose además la avascularización de la misma. Todo esto confiere a la córnea una de sus propiedades más importantes: su transparencia. Además la córnea se caracteriza por su gran capacidad refractiva, actuando como una lente convergente de 42 dioptrías. Con ello, la córnea justifica un 70% del poder de refracción total del ojo (American Academy of Ophthalmology., 2006).

### **2.2.2. Teoría de la transparencia**

Las mayores fuentes de dispersión de la luz en la córnea son la capa más superficial del epitelio corneal y el endotelio corneal ya que determinan la interfase con la película lagrimal y el humor acuoso, respectivamente, que tienen un índice de refracción ( $IR = 1.00$ ) mucho menor que las células ( $IR = 1.3$ ). En el estroma corneal la dispersión de la luz sólo se da en el núcleo de los queratocitos, sin afectarse la luz al pasar por el citoplasma de la célula (Jester, 2008).

Teniendo en cuenta que el estroma está compuesto de colágeno, agua, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, los cuales tienen índices de refracción que van de 1.47 a 1.35, el estroma corneal debería de ser opaco como es la dermis o la esclera. Sin embargo, gracias a la organización de las fibras de colágeno anteriormente



comentada, junto con su pequeño tamaño (32 nm) y el espacio uniforme entre estas (64 nm) conforman una estructura perfecta que guía la luz a su través sin dispersarla (Maurice, 1957).

Aplicando la teoría de Later, Goldman y Benedek, (Goldman and Benedek, 1967, Benedek, 1971) encontramos que al ser la distancia de las estructuras dispersantes (en este caso, las fibras de colágeno) menor o igual a la mitad de la longitud de onda de la luz visible (400-700 nm), el medio ha de ser transparente. Sin embargo, cuando el índice de refracción fluctúa en distancias mayores a la mitad de la longitud de onda, o 200 nm, la dispersión de la luz aumenta y es detectable.

Estas teorías se pueden aplicar a las células, especialmente al epitelio corneal y a los queratocitos. Las células contienen una serie de organelas y otros elementos que son estructuras potencialmente capaces de dispersar la luz dentro de las mismas (Moller-Pedersen, 2004). Además, los queratocitos están inmersos en una matriz de colágeno separando las fibrillas de colágeno en torno a 200 a 600 nm (distancia igual al grosor de dichas células), lo que conllevaría la máxima dispersión en la interfase creada entre las lamelas de colágeno. Aún cuando todo indica que la dispersión de la luz en la córnea debería ser significativa, encontramos que el epitelio y los queratocitos (exceptuando el núcleo) han conseguido minimizar las fluctuaciones en el índice de refracción consiguiendo así una disminución de dicha dispersión y volverse así transparentes.

### 2.2.3. Cristalinas corneales expresadas en queratocitos

La córnea ha desarrollado un mecanismo para aumentar la transparencia y minimizar las fluctuaciones en el índice de refracción al expresar una serie de proteínas hidrosolubles llamadas cristalinas. Estas controlan los cambios que acontecen en torno al citoplasma de la célula tanto en los queratocitos como en las células epiteliales corneales (Jester, 2008). El patrón de expresión de las cristalinas entre ambas poblaciones celulares es muy similar, encontrando mínimas diferencias que se podrían explicar por el distinto origen embriológico de las mismas.

Además, existe una especificidad de especie en el patrón de expresión de las cristalinas. Los queratocitos de los mamíferos expresan abundante ALDH3A1/1A1 al igual que el epitelio corneal. Así, los queratocitos aislados de córneas de cerdo muestran una gran expresión de ALDH3A1/1A1, representando el 55% del total de cristalinas expresadas. Este gen sin embargo no se expresa en queratocitos de pollo. Los queratocitos de conejo expresan grandes cantidades de TKT y ALDH1A1/ $\eta$ -crystalina, conformando un 14% y un 12.7% respectivamente del total de cristalinas expresadas. Las células epiteliales corneales de conejo expresan predominantemente láctico deshidrogenasa/ $\epsilon$ -crystalina (14.7%) y a menores niveles TKT (7.5%), G3PDH/ $\pi$ -crystalina (6.9%), y  $\alpha$ -enolasa/ $\tau$ -crystalina (4.5%) (Jester *et al.*, 2005).

#### **2.2.4. Opacificación corneal, dispersión celular de la luz y la expresión corneal de cristalinas**

Una agresión hacia la córnea, particularmente al estroma, con frecuencia promueve una activación de los queratocitos. Posteriormente, estos migrarán y se diferenciarán hacia fibroblastos y miofibroblastos, los cuales participarán en la respuesta a dicha agresión creando una zona de fibrosis a ese nivel. Esta reacción fibrótica provocará opacificación corneal y pérdida focal de la transparencia (Jester *et al.*, 1999).

Durante años, el desarrollo de fibrosis y la posterior opacificación corneal se ha explicado mediante el depósito anormal de colágeno y proteoglicanos por parte de los fibroblastos y miofibroblastos tras la lesión. Normalmente, los queratocitos sintetizan colágeno tipo I y tipo V conjuntamente con proteoglicanos como el keratan sulfato (KSPG). Ninguna otra célula expresa KSPG, jugando un papel primordial para la formación de haces de colágeno en el estroma con un tamaño y espacio entre las mismas adecuado (Funderburgh, 2000). Por otra parte, los queratocitos que se diferencian a fibroblastos y miofibroblastos pierden la capacidad de sintetizar KSPG y en su lugar expresan condroitin sulfato (CSPG) conjuntamente con colágeno de tipo I y III (Hassell *et al.*, 1983, Cintron *et al.*, 1988).

La dispersión celular de la luz se puede observar tanto en la opacificación corneal como en agresiones corneales más leves que no conllevan opacificación corneal pero sí una migración de fibroblastos sin la presencia de miofibroblastos (Moller-Pedersen *et al.*, 1998). Curiosamente, la dispersión de la luz y la opacificación corneal desaparecen conforme los fibroblastos se vuelven a diferenciar en

queratocitos tras repoblar el estroma corneal. Este mecanismo de reparación acontece cuando se produce una congelación localizada de la córnea donde los fibroblastos migran y muestran un patrón de expresión caracterizado por la pérdida de expresión de ALDH1A1 y una disminución de TKT (Jester *et al.*, 1999).

En humanos, se ha comprobado que las células estromales aisladas de córneas opacificadas o fibróticas tras un rechazo en un trasplante corneal o una cicatrización tras una agresión corneal, cambian el patrón de expresión siendo positivas para Thy-1 o  $\alpha$ -actina de músculo liso, no expresando ALDH3A1 (Pei *et al.*, 2006).

### **2.2.5. Desarrollo de la transparencia y la expresión de cristalinas corneales**

La córnea de la mayoría de los mamíferos es translúcida en el momento del nacimiento y sólo comienza a desarrollar la transparencia característica de ésta tras la apertura palpebral (Smelser and Ozanics, 1956, Zinn and Mockel-Pohl, 1975), cuando disminuye la dispersión de la luz por parte de las células estromales y empieza a limitarse al núcleo de los queratocitos (Jester *et al.*, 2007).

Además, la disminución de la dispersión de la luz muestra una fuerte correlación con la disminución de la densidad celular, aunque el nivel de dispersión a nivel de una sola célula se mantiene constante hasta la apertura palpebral. La caída en el nivel de dispersión celular de la luz se asocia con dos importantes eventos a nivel celular: la salida del ciclo celular por parte de los queratocitos y el incremento en la expresión de ALDH1A1 tras la apertura palpebral. Estos datos coinciden con algunos

estudios en animales donde se observa un aumento en la expresión de TKT y ALDH3A1 tras la apertura palpebral (Sax *et al.*, 2000, Downes and Holmes, 1992).

### **3. PATOLOGÍA CORNEAL Y SU TRATAMIENTO:**

#### **3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PATOLOGÍA CORNEAL. LA CEGUERA CORNEAL.**

La patología corneal es una de las mayores causas de ceguera en el mundo, sólo superada por la catarata; aún así, hasta el 90% de los casos de ceguera es consecuencia directa de la patología corneal en algunas zonas de África (Schwartz *et al.*, 1997). La complejidad epidemiológica de la ceguera corneal se debe en parte a la gran variedad de oftalmopatías infecciosas e inflamatorias que acaban causando cicatrización corneal, la cual finalmente conduce a la ceguera funcional. Así, actualmente se calculan cerca de 4,9 millones de personas que sufren ceguera debido al tracoma, en su mayoría por un proceso de cicatrización y vascularización corneal. Los traumatismos oculares y la ulceración corneal también son causas importantes de ceguera corneal a nivel mundial ya que pueden dar lugar a 1,5-2,0 millones de casos nuevos de ceguera monocular cada año (Whitcher *et al.*, 2001).

En relación con la ceguera infantil corneal, aproximadamente 1,5 millones en todo el mundo la padecen, teniendo en cuenta que 5 millones de personas sufren discapacidad visual (Hornby *et al.*, 1999). Entre las causas más importantes de la misma encontramos la xeroftalmía (350000 casos anuales), la oftalmía del recién nacido, las infecciones por el virus herpes simplex y la queratoconjuntivitis vernal. Hay que tener en cuenta también, que enfermedades como la oncocercosis y la lepra, erradicadas en occidente, son todavía una causa fundamental de ceguera, afectando a más de 500000 personas. Además, las medicinas tradicionales en relación con las

oftalmopatías han constituido un factor de riesgo primordial en relación con la actual epidemia de ulceración corneal en los países en desarrollo (Whitcher *et al.*, 2001).

En la gran mayoría de casos de ceguera corneal, el tratamiento idóneo sería un trasplante de córnea. Sin embargo, las infraestructuras que requiere éste, junto con la necesidad de un control exhaustivo de los pacientes para evitar posibles complicaciones, hacen que los programas preventivos de salud pública constituyan la opción más eficaz en relación al costo para reducir la carga mundial de ceguera corneal. En los países desarrollados, las patologías corneales severas suelen ser abordadas mediante otros procedimientos terapéuticos, como el trasplante corneal, que conllevan grandes costes humanos y materiales.

### 3.2. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS A LA PATOLOGÍA CORNEAL SEVERA.

Existe un gran número de patologías que pueden afectar a la córnea. La mayoría de ellas son susceptibles de tratamiento médico gracias a la capacidad regenerativa de la córnea. Sin embargo, en muchos casos la agresión a los tejidos corneales crea un daño permanente sobre estos, necesitando una sustitución tisular que cumpla las funciones ópticas y de barrera de la córnea sana, para evitar así la pérdida de visión y la posible pérdida del globo ocular. Además, en aquellas patologías donde la desestructuración tisular es máxima y existe la posibilidad de perforación ocular, es necesario aplicar tratamientos que satisfagan la función de barrera, obviando casi en su totalidad la función óptica.

#### 3.2.1. Queratoplastias

La queratoplastia o trasplante corneal es la técnica más utilizada por sus buenos resultados y la gran experiencia que se tiene sobre la misma. Sin embargo, ésta implica dos grandes inconvenientes: la escasez de donantes y la posibilidad de rechazo del injerto (Klebe *et al.*, 2009). Existen distintos tipos de queratoplastias en función del espesor corneal del injerto trasplantado. Así, las queratoplastias penetrantes consisten en la implantación de un segmento corneal de espesor completo, que proviene de un donante cadáver (aloinjerto). En las queratoplastias lamelares se reemplaza únicamente el tejido corneal dañado por tejido corneal de donante cadáver, dejando intacto el tejido sano (Baddon *et al.*, 2010, Price and Price, 2008).



<i>Queratoplastia penetrante</i>	<i>Queratoplastia lamelar</i>
Edema corneal fáquico/pseudofáquico	Distrofias y degeneraciones epitelioestromales
Distrofias/degeneraciones corneales	Cicatriz superficial corneal
Reinjerto	Pterygium múltiple recurrente
Queratitis (ulcerativa) infecciosa/no infecciosa	Adelgazamiento corneal
Trauma mecánico	Tumores superficiales corneales
Opacidad congénita	Lesiones congénitas
Causticaciones	Perforaciones corneales que no son susceptibles de ser resuturadas o que ocurren en paciente con enfermedad superficial ocular (pe. queratitis sicca)
Óptica o refractiva	Infecciones específicas (pe. acanthamoeba)

**Tabla 1:** Principales indicaciones para la realización de queratoplastia penetrante o lamelar.

Existen queratoplastias lamelares anteriores donde el tejido sustituido es el epitelio y el estroma en mayor o menor medida, y las queratoplastias lamelares posteriores o queratoplastias endoteliales donde se sustituye el endotelio corneal y la membrana de Descemet (Dapena *et al.*, 2009). En relación con las queratoplastias lamelares anteriores, encontramos distintos subtipos según la profundidad alcanzada, llegando a la queratoplastia lamelar anterior profunda (DALK, del inglés “*Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*”), donde se sustituye todo el tejido estromal respetando la membrana de Descemet y el endotelio (Sugita and Kondo, 1997). Las indicaciones principales de cada una de ellas se reflejan en la tabla 1.

### 3.2.2. Membrana amniótica y recubrimiento conjuntival

La membrana amniótica (MA) se ha utilizado en distintas disciplinas médicas con el fin de regenerar tejidos diversos (Niknejad *et al.*, 2008). La membrana amniótica se compone de cinco capas: epitelio, membrana basal y tres capas mesenquimatosas (capa esponjosa, capa de fibroblastos y capa compacta). Según la orientación de la membrana amniótica a la hora de implantarla sobre la córnea afectada, podemos distinguir entre injerto o recubrimiento, aumentando así las indicaciones de la misma (TABLA 2) (Gomes *et al.*, 2005).

En aquellos casos donde se usa como injerto, se orienta la cara epitelial hacia arriba y se coloca en el interior del lecho ulceroso o defecto estromal, para favorecer el crecimiento del epitelio corneal sobre la membrana basal de la MA (Nubile *et al.*, 2008). Cuando la MA se utiliza como recubrimiento, con el fin de reducir el proceso inflamatorio, favorecer la regeneración epitelial corneal y disminuir el proceso de cicatrización bajo la membrana, es necesario recubrir la superficie corneal con el fragmento de MA, generalmente con la cara epitelial hacia el exterior, sobrepasando los márgenes del defecto epitelial, a modo de lente de contacto terapéutica temporal que se reabsorberá en 3-4 semanas, tras haber cumplido su función antiinflamatoria y de barrera mecánica (Azura-Blanco *et al.*, 1999). La MA también se puede utilizar a modo de multicapa, para tratar úlceras profundas o perforaciones de pequeño tamaño (Prabhasawat *et al.*, 2001). La membrana amniótica también se ha utilizado como sustrato para el cultivo de las células germinales epiteliales del limbo esclerocorneal (Mariappan *et al.*, 2010).

Otro procedimiento terapéutico que busca la creación de una barrera mecánica a nivel corneal es el recubrimiento conjuntival. La técnica se realiza disecando una porción de conjuntiva próxima al lugar de la lesión corneal, la cual será cubierta con dicha conjuntiva disecada tras suturar ésta (Arruga, 1963). Su uso ha decrecido gracias al empleo de nuevos agentes antimicrobianos, al aumento de las indicaciones de queratoplastias penetrantes, el uso de lentes terapéuticas y la mejora en los tratamientos de enfermedades corneales inflamatorias (Khodadoust and Quinter, 2003). Sin embargo, la realización de un recubrimiento conjuntival aún tiene una serie de indicaciones en las que conservar la función óptica no es una prioridad (TABLA 2) (Lim *et al.*, 2009a).

<i>Recubrimiento conjuntival</i>	<i>Membrana amniótica</i>
Ulceración crónica estéril epitelial y estromal: queratitis herpética por virus del herpes simple, causticaciones y quemaduras, queratoconjuntivitis sicca, úlceras postinfecciosas, queratopatía neurotrófica	Defectos epiteliales corneales persistentes ulcerados
Heridas corneales cerradas pero inestables	Insuficiencia límbica parcial
Queratopatía bullosa dolorosa en un paciente que no es buen candidato para realización de queratoplastia penetrante	Causticaciones/quemadura térmica
Ojo ptísico para prótesis	Queratopatía bullosa dolorosa
Perforación corneal	Síndrome de Stevens-Johnson/Lyell
Otras	Queratopatía en banda

**Tabla 2:** Principales indicaciones para la realización de un recubrimiento conjuntival o plastia con membrana amniótica.

### 3.2.3. Queratoprótesis

Las queratoprótesis se basan en la implantación de sustitutos corneales artificiales no biológicos. 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 [politetrafluoruro expandido], Dacron, PHEMA...) que permite la migración celular desde el huésped hacia la prótesis para contribuir al anclaje de ésta (Gomaa *et al.*, 2010).

Se suelen indicar en casos de cicatrización corneal severa bilateral complicada por patología de la superficie ocular como, por ejemplo, conjuntivalización secundaria a insuficiencia limbar u ojo seco severo, o en casos con mala respuesta a la queratoplastia penetrante, como rechazos repetidos del injerto (TABLA 3). Existen distintos tipos como la osteo-odonto queratoprótesis, osteo-queratoprótesis con tibia o queratoprótesis de Boston Tipo I (Liu *et al.*, 2008). Suelen ser el último recurso, teniendo que cumplir diversos requisitos para su implantación (FIGURA 6).

<i>Queratoprótesis</i>
Cicatrización corneal severa bilateral complicada por patología de la superficie ocular (conjuntivalización secundaria a insuficiencia limbar, ojo seco severo, fallo de injerto...)
Causticaciones/quemadura térmica
Pemfigoide ocular cicatricial
Síndrome de Stevens-Johnson/Lyell
Tracoma cicatricial ocular

**Tabla 3:** Principales indicaciones para el uso de queratoprótesis.



**Figura 6:** Requisitos para la implantación de la queratoprótesis BostonKpro.

### 3.2.4. El limbo esclerocorneal como fuente de tratamientos regenerativos corneales

El limbo esclerocorneal es una fuente primordial de células madre en relación con distintos procedimientos terapéuticos para resolver en su mayoría enfermedades que causan una deficiencia limbal de células madre (LSCD, del inglés “*limbal stem cell deficiency*”) (Lim *et al.*, 2009b). Dicha deficiencia limbal se ha definido como la destrucción o la disfunción de las células madre que contiene el epitelio límbico debido a diversas causas (TABLA 4) (Vemuganti *et al.*, 2009). Esto conlleva un fracaso de la regeneración del epitelio corneal, con la consiguiente re-epitelización por parte de las células epiteliales conjuntivales, asociado a un proceso de inflamación crónica, cicatrización estromal, neovascularización y defectos epiteliales persistentes (DEP) (Notara *et al.*, 2010). La LSCD puede clasificarse como parcial o total, teniendo en cuenta que en la deficiencia parcial existe un déficit de LSC en una región localizada del limbo dando lugar a conjuntivalización sectorial, frente al LSCD completa donde existe una disfunción o destrucción de toda la población de LSC causando la conjuntivalización de toda la córnea (Vemuganti *et al.*, 2009, Notara and Daniels, 2008).

<i>Pérdida destructiva de las LSCs</i>	<i>Disfunción del nicho limbal</i>
Quemaduras químicas o térmicas	Aniridia/ coloboma del iris
Enfermedad de Steven Johnson	Déficit endocrinos múltiples
Múltiples cirugías o crioterapias sobre el limbo (iatrogenia)	Limbitis crónica o inflamación periférica/enfermedades ulcerativas
Queratopatía inducida por lentes de contacto	Queratopatía neurotrófica (neuronal o isquémica)
Queratitis infecciosa severa	Pterygium o pseudopterygium
Uso de citostáticos (5FU, MMC)	Queratopatía bullosa crónica
Irradiación	Idiopática

**Tabla 4:** Clasificación de las patologías corneales causantes de la deficiencia limbar según su causa.

El tratamiento definitivo de la LSCD es el trasplante de limbo usando auto o aloinjertos limbares. En casos unilaterales con LSCD completa, se aconseja utilizar un autoinjerto limbal. De forma experimental, algunos grupos realizan el trasplante de LSC cultivadas *ex vivo* procedentes del otro ojo (Miri *et al.*, 2010, Notara and Daniels, 2008). En los casos de LSCD completa bilateral o unilateral en pacientes con un solo ojo, la única opción de tratamiento es la realización de un aloinjerto limbal de donante cadáver o de un familiar vivo, el cual se puede cultivar *ex vivo* para implantar las LSC cultivadas (Miri *et al.*, 2010), o el trasplante de células madre de otras localizaciones como la mucosa oral (Nishida *et al.*, 2004b), considerándose estas técnicas de carácter

experimental. En LSCD parciales, un fragmento de tejido del limbo del ojo sano puede cultivarse y posteriormente trasplantarse a la zona de epitelio enfermo. Otra técnica descrita es la translocación de tejido limbal ipsilateral sano al área afecta por el LSCD. En relación con el cultivo *ex vivo* de LSCs para la obtención de células limbares epiteliales, hemos de tener en cuenta los distintos sustratos sobre los cuales realizar dicho cultivo para poder, posteriormente, realizar el trasplante de estos sobre la córnea afecta (TABLA 5) (Vemuganti *et al.*, 2009). Todas estas técnicas en las que se combinan células limbares sobre cualquier estrato se consideran medicamentos de Terapias Avanzadas de Ingeniería Tisular y en los casos en que se están aplicando en pacientes constituyen terapias todavía experimentales.

<i>Sustrato usado</i>	<i>Grupo</i>	<i>Año</i>	<i>Aplicación</i>
Membrana amniótica humana	(Schwab <i>et al.</i> , 2000)	2000	Clínica
	(Tsai <i>et al.</i> , 2000)	2000	Clínica
	(Sangwan <i>et al.</i> , 2003)	2003	Clínica
	(Wang <i>et al.</i> , 2003)	2003	Investigación
	(Sangwan <i>et al.</i> , 2006)	2006	Clínica
	(Schwab <i>et al.</i> , 2000)	1999	Clínica
	(Tsai <i>et al.</i> , 2000)	2000	Clínica
	(Pauklin <i>et al.</i> , 2010)	2010	Clínica
	(Thanos <i>et al.</i> , 2010)	2010	Clínica
	(Kolli <i>et al.</i> , 2010)	2010	Clínica



<i>Sustrato usado</i>	<i>Grupo</i>	<i>Año</i>	<i>Aplicación</i>
Fibrina	(Pellegrini <i>et al.</i> , 1997)	1999	Clínica
	(Talbot <i>et al.</i> , 2006)	2006	Investigación
	(Rama <i>et al.</i> , 2010)	2010	Clínica
Estroma corneal	(España <i>et al.</i> , 2003)	2003	Investigación
Lentes de contacto	(Pellegrini <i>et al.</i> , 1997)	1997	Clínica
	(Di Girolamo <i>et al.</i> , 2007)	2007	Investigación
Insertos porosos para cultivo celular	(Koizumi <i>et al.</i> , 2002)	2002	Investigación
Superficies recubiertas por distintos compuestos (laminina, fibronectina, colágeno IV)	(Nakagawa <i>et al.</i> , 1990)	1990	Investigación
	(Schwab <i>et al.</i> , 2000)	2000	Clínica
	(Li <i>et al.</i> , 2005)	2005	Investigación
Geles de poli (N-isopropilacrilamida) con respuesta a los cambios de temperatura	(Nishida <i>et al.</i> , 2004a)	2004	Investigación
	(Sitalakshmi <i>et al.</i> , 2009)	2009	Investigación
	(Sudha <i>et al.</i> , 2006)	2006	Investigación
Myogel	(Francis <i>et al.</i> , 2009)	2009	Investigación
Matrices artificiales de colágeno	(Dravida <i>et al.</i> , 2008)	2008	Investigación

**Tabla 5:** Distintos sustratos usados por varios grupos para el cultivo de células limbares epiteliales.

#### **4. GENERACIÓN DE CÓRNEAS ARTIFICIALES: EL IMPACTO DE LA INGENIERÍA TISULAR**

Los procedimientos terapéuticos hoy día aplicados a la patología corneal severa, descritos anteriormente, buscan la restauración funcional corneal tanto a nivel óptico como de barrera. Sin embargo, en la mayoría de casos, la restauración visual completa y mantenida a lo largo del tiempo se convierte en un objetivo difícil de alcanzar debido a todas las complicaciones que implican dichos tratamientos en relación con la integridad en los tejidos del receptor y la tolerabilidad inmunológica. Además, siempre se ha de conservar la función de barrera con el fin de mantener la integridad del globo ocular, intentado restablecer posteriormente la función óptica si fuera necesario.

Todos los inconvenientes que pueden conllevar dichos tratamientos, junto con la escasez de donantes y en cierta medida, la difícil accesibilidad que muchos de ellos implican, marcan la necesidad de paliar dichas deficiencias generando un sustituto corneal humano mediante técnicas de Ingeniería Tisular, área científica multidisciplinaria 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 (Campos, 2004).

Se han establecido distintas características que idealmente deben de cumplir los sustitutos corneales creados por Ingeniería Tisular (Shah *et al.*, 2008):

- El constructo debe permanecer estable en el ojo receptor durante largos períodos de tiempo, y no debe actuar como un estímulo inflamatorio o inmunológico.
- La óptica central debe ser transparente y formar una imagen de alta calidad sobre la retina.
- 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.
- 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.
- El componente periférico debe permitir el paso de nutrientes a su través.
- La superficie anterior debe estar cubierta por epitelio corneal que sea capaz de repararse ante una agresión externa.
- 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.
- El constructo debe estimular la inervación del mismo, permitiendo el avance y crecimiento de las terminaciones nerviosas hasta el epitelio corneal.

- El constructo no ha de promover la neovascularización, evitando así el crecimiento anómalo de vasos en su interior.
- El constructo corneal debe permitir que las células se adhieran, proliferen y migren a través del mismo.

Para conseguir todo esto, se han creado distintas aproximaciones por diversos grupos que trabajan en la Ingeniería Tisular de la córnea. Por un lado, aquellos que aplican el concepto clásico y más utilizado de la Ingeniería Tisular, basado en la elaboración de constructos a partir de distintos biomateriales como componentes elementales de la matriz extracelular sobre la cual crezcan y se diferencien las células. Por otro lado, aquellos que han adaptado un concepto emergente en la Ingeniería Tisular, ya aplicado en la creación de otros tejidos, basado en la utilización de matrices ya creadas por la naturaleza para dicha función, es decir, la utilización de estromas corneales animales a los cuales se extraen sus células (descelularización) para poder insertar las células humanas de interés (recelularización). Por último, el concepto a aplicar en la Ingeniería Tisular de la córnea y que aún nadie ha desarrollado, es la aproximación ontogénica basada en el desarrollo embriológico corneal, intentado desarrollar un primordio corneal que una vez implantado, desarrollase una córnea adulta.

#### 4.1. INGENIERÍA TISULAR MEDIANTE LA ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS

La mayoría de investigadores dedicados a la generación de un sustituto corneal han aplicado el concepto de la Ingeniería Tisular clásica en su diseño y desarrollo. La conjunción de los distintos elementos básicos que pueden conformar una matriz extracelular corneal, da cierta libertad al investigador para modificar en cierta medida la composición de ésta de manera artificial, pudiendo así intensificar determinadas propiedades que considere más necesarias en su modelo. Además, la introducción e integración de las células con dicha matriz creada desde cero en el laboratorio se establece como un proceso simplificado al convertirse el componente celular en un elemento más dentro de esa amalgama tisular creada *in vitro*.

En relación con el concepto de Ingeniería Tisular clásica, el proceso utilizado ha consistido en elaborar de forma separada los distintos componentes del tejido artificial a construir procediendo con posterioridad al ensamblaje de dichos componentes. Así, se han desarrollado distintos protocolos donde se han generado parte de los elementos estructurales de una córnea completa, empezando la mayoría por la elaboración de un estroma acelular (Duan *et al.*, 2006). Con posterioridad, se desarrolla el protocolo para crear dicho estroma introduciendo queratocitos corneales en el mismo durante el proceso de fabricación. Una vez caracterizado éste, en la mayoría de casos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se prosigue hacia la siguiente etapa para generar un sustituto corneal, añadiendo el componente celular epitelial sobre el estroma celular creado previamente (Suuronen *et al.*, 2005, Selvam *et al.*, 2006). Pocos son los grupos que han continuado con el desarrollo de un constructo corneal

completo con la adición del componente endotelial (Alaminos *et al.*, 2006, Doillon *et al.*, 2003).

Múltiples son los componentes del estroma corneal utilizados por los distintos grupos, sin embargo, en la mayoría prevalece el uso del colágeno como base para la fabricación de dicha matriz extracelular (Cen *et al.*, 2008, Dogru and Tsubota, 2005). Se han desarrollado protocolos mediante el uso de colágeno tipo I o tipo III (Merrett *et al.*, 2008), llegando algunos grupos a mezclar ambos, incluso adicionando otros elementos como quitosán, laminina, glucosaminoglicanos o metacriloxietil fosforilcolina (Rafat *et al.*, 2008). En la mayoría de protocolos se aplica la técnica de cross-linking sobre dichas matrices para aumentar la consistencia y resistencia de las mismas (McLaughlin *et al.*, 2008). En otros casos la matriz de colágeno se crea a modo de películas superficiales con un patrón determinado por maquinaria de precisión nanoestructural (Vrana *et al.*, 2007). Además, se han usado otros componentes básicos distintos al colágeno para la creación del estroma corneal: proteínas de la seda, fibrina, fibrina y agarosa, ácido poliglicólico, etc (Alaminos *et al.*, 2006, Lawrence *et al.*, 2009).

Los sustitutos corneales fabricados a partir de colágeno son poco estables y resistentes, tendiendo a degradarse en poco tiempo, además de ser un material costoso y que tiende a contraerse y a perder volumen cuando se cultivan células en su interior (Hiraoka *et al.*, 2003). Por ello, para paliar en parte estas dificultades, actualmente se somete al colágeno tipo I o III a diversas técnicas de entrecruzamiento (*cross-linking*) (Bentley *et al.*, 2010, McLaughlin *et al.*, 2010). Además, la adición de algunos glucosaminoglicanos al colágeno tipo I, aumenta la transparencia y disminuye la retracción del gel de colágeno (Vrana *et al.*, 2008). Otras sustancias como el alcohol

polivinílico o la hidroxiapatita (Xu *et al.*, 2008a) y los péptidos de adhesión epitelial unidos a dendrímeros (Duan *et al.*, 2007, Duan and Sheardown, 2006), permiten una correcta adhesión y estratificación de las células epiteliales corneales depositadas sobre estos. Además, hemos de tener que, mediante Ingeniería Genética se puede obtener el colágeno humano de distintos tipos, evitando así el riesgo de transmisión de infecciones y de reacciones inmunológicas que supone la utilización de colágeno animal (Merrett *et al.*, 2008).

En relación con compuestos como la fibrina o la mezcla de fibrina-agarosa, encontramos distintas ventajas e inconvenientes. Por un lado los geles de fibrina tienen una limitada consistencia y transparencia, aunque ofrecen ventajas tales como su disponibilidad, la alta integración celular en estos, la ausencia de contracción del gel fabricado y la posibilidad de su obtención autóloga a partir de sangre del propio paciente (Meana *et al.*, 1998, Llames *et al.*, 2004). La agarosa y otros compuestos, conllevan una limitación en torno a la adhesión celular sobre estos, inhibiendo en parte la proliferación celular, sin embargo presentan una correcta transparencia y consistencia (Cao *et al.*, 2009). No obstante, la adición de agarosa a la fibrina para generar un sustituto estromal conforma un gel que mejora la transparencia y consistencia de los geles de fibrina, además de presentar una correcta transparencia y adhesión celular, no experimentando la retracción observada en los geles de colágeno (Garzon *et al.*, 2009, Alaminos *et al.*, 2006).

Sobre estos constructos estromales creados en laboratorio se ha de introducir el componente celular. La integración de los queratocitos corneales humanos se desarrolla en el mismo proceso de creación del estroma. Una vez generado el estroma

corneal en su totalidad, en relación con el componente fibrilar y celular, se procede generalmente a la adición del componente celular epitelial, procedente en su mayoría del limbo esclerocorneal humano. Los trabajos que describen cierto éxito en la generación de una hemicórnea funcional y viable se han desarrollado a partir del uso de materiales para la creación del componente fibrilar estromal basados en colágeno, fibrina y agarosa, polietilenglicol y ácido poliacrílico, o técnicas de cocultivo con superposición de láminas celulares (Myung *et al.*, 2007, Torbet *et al.*, 2007, Gonzalez-Andrades *et al.*, 2009, Mi *et al.*, 2010, Vrana *et al.*, 2007, Reichl *et al.*, 2004).

Pocos son los que han completado el desarrollo de un modelo corneal completo con la adición del componente endotelial, sobre los otros dos componentes básicos, epitelial y estromal, ya integrados. Por un lado, el modelo desarrollado por nuestro grupo de investigación basado en la mezcla de fibrina y agarosa para crear una córnea artificial de conejo, integrando sobre dichos materiales el componente celular epitelial, estromal y endotelial (Alaminos *et al.*, 2006). Por otro lado, otros grupos han generado un sustituto corneal humano completo a pesar de la dificultad que implica el cultivo de células corneales endoteliales humanas. La generación de estos modelos humanos se ha basado en el uso de colágenos con la suma o no de glucosaminoglicanos, adicionando el componente celular humano corneal correspondiente, usando células humanas endoteliales transfectadas para paliar las dificultades que implica el uso de células endoteliales corneales nativas adultas (Vrana *et al.*, 2008).

Algunos investigadores han planteado el desarrollo de un sustituto corneal humano parcial en relación con las necesidades que marca la patología corneal, ya que



en muchos casos el componente dañado fundamental se localiza a nivel más superficial alterando el epitelio corneal o a nivel más profundo, afectando al endotelio corneal. En primer lugar, ya comentado con anterioridad en esta tesis, encontramos el desarrollo avanzado del cultivo de epitelio corneal a partir de células madre obtenidas del limbo esclerocorneal, sobre distintos tipos de sustratos: fibrina, membrana amniótica, estroma corneal, lentes de contacto, insertos porosos para cultivo celular, superficies recubiertas por distintos compuestos (laminina, fibronectina, etc), geles de poli (*N*-isopropilacrilamida) con respuesta a los cambios de temperatura, myogel o matrices artificiales de colágeno (Vemuganti *et al.*, 2009).

En segundo lugar aparece la generación aislada del componente endotelial, la cual ha sido una de las tareas más costosas a la cual se han enfrentado los ingenieros tisulares para desarrollar y generar una córnea humana completa. Con anterioridad se habían establecido cultivos de endotelio corneal animal, como el bovino o de conejo, ya que su tasa de proliferación en cultivo es óptima, así como su viabilidad una vez transferidas las células sobre el constructo corneal (Gospodarowicz *et al.*, 1979). Sin embargo, el cultivo de endotelio humano, sólo prolifera bajo condiciones muy específicas y pocos han sido capaces de desarrollar un modelo viable para ello. Entre ellos la aproximación basada en el cultivo de células endoteliales corneales sobre distintos sustratos, es la que se ha establecido como el método con mayor éxito. Por un lado se ha usado un sustrato basado en la matriz extracelular fabricada por células endoteliales corneales de ternero, añadiendo factor de crecimiento fibroblástico y suero bovino fetal al medio de cultivo para el crecimiento de células endoteliales humanas (Amano, 2003). Por otro lado, se han empleado láminas de colágeno así

como geles de poli (*N*-isopropilacrilamida) con respuesta a los cambios de temperatura para cultivar sobre estos el endotelio corneal humano (Mimura *et al.*, 2004, Lai *et al.*, 2007).

En relación con las fuentes celulares empleadas en la elaboración de los constructos corneales, observamos una gran diversificación en torno a las especies usadas. Así, se han utilizados células corneales de distintas especies animales entre las cuales se encuentran el cerdo, el gato, el conejo o el humano (Alaminos *et al.*, 2006, Proulx *et al.*, 2009, Reichl and Muller-Goymann, 2003). Además, se han propuesto otras fuentes celulares de estirpes ajenas a la córnea, basándose generalmente en el origen embriológico de las mismas. Para sustituir al epitelio corneal humano se ha sugerido el uso de mucosa oral, epidermis del pabellón auricular, células madre mesenquimales provenientes de la médula ósea y células madre de pulpa dental inmadura humana (Gomes *et al.*, 2010). En relación con la sustitución de queratocitos y del endotelio corneal humano, se ha propuesto el empleo de células madre mesenquimales provenientes de la médula ósea o de la grasa (De Miguel *et al.*, 2010).

## 4.2. INGENIERÍA TISULAR MEDIANTE LA DESCELULARIZACIÓN DE ÓRGANOS NATIVOS

La descelularización es un proceso que permite eliminar eficazmente todas las células existentes en un tejido nativo preservando adecuadamente la matriz extracelular natural. De este modo, se pueden obtener matrices extracelulares de origen animal útiles para la generación de tejidos artificiales humanos con posible utilidad clínica. Frente a los tejidos artificiales basados en biomateriales poliméricos o de síntesis, los tejidos descelularizados conservan la compleja estructura de los tejidos naturales, incluyendo la sustancia fundamental amorfa, las fibras de colágeno, elastina y reticulina, proteínas globulares y todos los receptores necesarios para la adhesión y la proliferación celular (Gilbert *et al.*, 2006, Badylak, 2004).

Idealmente, un protocolo de descelularización óptimo debe ser capaz de cumplir cuatro criterios mayores de calidad:

- 1) Que sea altamente eficaz, conllevando la eliminación de todas las células y restos celulares (especialmente, proteínas y ácidos nucleicos) del xenoinjerto descelularizado.
- 2) Que exista la posibilidad de recelularizar los tejidos descelularizados usando células del propio receptor, ya sean humanas o de otro animal.
- 3) En el caso de la córnea, que su comportamiento óptico sea óptimo.
- 4) Que se elimine por completo el epítipo alfa-gal de todo el tejido, como se describirá más adelante.

Recientemente, diversos investigadores lograron descelularizar diferentes tipos de tejidos animales sin alterar significativamente su estructura, obteniendo de este

modo matrices extracelulares complejas y perfectamente estructuradas tridimensionalmente a partir de tejidos animales de fácil obtención. Concretamente, se han logrado descelularizar tejidos como el corazón, los vasos sanguíneos, el riñón o la vejiga urinaria utilizando métodos basados en protocolos físicos, químicos y enzimáticos (Yang *et al.*, 2010, Nakayama *et al.*, 2010, Funamoto *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, los tejidos sometidos a procesos de descelularización pudieron ser posteriormente recelularizados con diferentes tipos de células humanas o animales previamente mantenidas en cultivo.

A pesar de los avances logrados, una de las mayores limitaciones de los xenotransplantes descelularizados para aplicación clínica en humanos es la existencia de anticuerpos naturales frente al epítipo terminal de la galactosa-alfa-1,3-galactosa, llamado epítipo alfa-gal. Dicho epítipo se expresa en las membranas celulares de todos los mamíferos excepto los primates. Su importancia deriva de que el epítipo alfa-gal puede mediar el rechazo hiperagudo o retardado del xenoinjerto una vez implantado en el ser humano (Badylak, 2004). Idealmente, el protocolo de descelularización utilizado para uso clínico debería ser capaz de eliminar eficientemente las células animales, incluyendo todos los restos de ácidos nucleicos, así como las proteínas alfa-gal. Sin embargo, la estructura de la matriz extracelular debería mantenerse intacta durante el proceso.

En lo que respecta a la córnea, son varios los animales que podrían utilizarse como fuente de córneas susceptibles de descelularización para uso clínico potencial. Por su disponibilidad, facilidad de mantenimiento en cautividad y similitud estructural con el ser humano, el cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) es un excelente

candidato para la obtención de xenoinjertos corneales descelularizados (Zeng *et al.*, 2001). De hecho, la mayoría de los protocolos de descelularización previamente optimizados en tejidos diferentes a la córnea (Gilbert *et al.*, 2006) serían susceptibles de aplicación a la córnea porcina. Hasta el momento, son muy escasos los métodos de descelularización que se han aplicado a la córnea animal, no habiéndose logrado hasta ahora la recelularización posterior con células humanas. Además, aún no se ha conseguido optimizar ningún protocolo de descelularización corneal capaz de cumplir los cuatro criterios mayores anteriormente mencionados, dado que la transparencia de la córnea es altamente dependiente de dos parámetros mayores: la estructura de la matriz estromal (Meek *et al.*, 2003) y la forma, tamaño, densidad y estructura de las células corneales (Mourant *et al.*, 2000). De hecho, Meek y cols. (Meek *et al.*, 2003) demostraron que la desestructuración o el aumento en el grosor de las fibras del estroma corneal podían conllevar un aumento en la dispersión de la luz y, por tanto, una pérdida significativa de transparencia durante el proceso de descelularización (Freund *et al.*, 1986). Por ello, los protocolos aplicados a la córnea deberían ser especialmente eficientes a la hora de mantener la matriz extracelular corneal en su totalidad, lo cual obliga a profundizar en la búsqueda de nuevos métodos y técnicas aplicables a la córnea (TABLA 6).

<i>Procedencia animal</i>	<i>Descelularización</i>	<i>Recelularización in vitro</i>	<i>Implantación in vivo</i>	<i>Referencia</i>
Porcina	Nitrógeno líquido	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Oh <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	NaCl 1.5M + Tris-EDTA (0.05%-0.02%)	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Oh <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Glicerol 98% + Tris-EDTA (0.05%-0.02%)	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Oh <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Tris (0.25%)+SDS 0.1%	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Oh <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	NaOH 0.1M + DNase-RNase (40 U/ml)	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Oh <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Tris-HCl (1mM) + Triton X100 (1%) + Tripsina-EDTA (0.25%) + DNase-RNase	Conejo (limbo – sin especificar)	Bolsillo intraestromal en conejo	(Xu <i>et al.</i> , 2008b)
Bovina	Tripsina 0.25%	Conejo (limbo – sin especificar)	No	(Zhang <i>et al.</i> , 2005)
Porcina	Tripsina + DNase-RNase	Conejo (queratocitos)	Bolsillo intraestromal en conejo	(Zhang <i>et al.</i> , 2006)
No accesible	No accesible	No accesible	No accesible	(Nie <i>et al.</i> , 2006)
Porcina	Tris-HCl (1mM) + Triton X100 (1%) + Tripsina-EDTA (0.25%) + DNase-RNase	Conejo (queratocitos)	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Porcina	Triton X100 (1%)	Conejo (epitelio y endotelio)	No	(Fan <i>et al.</i> , 2007)
Porcina	Nitrógeno gaseoso	No	Bolsillo intraestromal en conejo	(Amano <i>et al.</i> , 2008)
Conejo	Triton X100 + Tripsina	Conejo (limbo – sin especificar)	No	(Fang <i>et al.</i> , 2008b)
Conejo	NaCl + SDS + Tripsina	Conejo (limbo – sin especificar)	No	(Fang <i>et al.</i> , 2008b)
Porcina	Triton X100	No	Bolsillo intraestromal en conejo	(Fang <i>et al.</i> , 2008a)
Porcina	Tripsina (2.5%) + Nitrógeno líquido + NaOH (0.1M) + DNase-RNase	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Lin <i>et al.</i> , 2008)
Bovina	SDS 1% + Etanol 75%	Queratocitos (sin especificar especie)	No	(Ponce Marquez <i>et al.</i> , 2009)

Bovina	Etanol 75% + Tripsina-EDTA	Queratocitos (sin especificar especie)	No	(Ponce Marquez <i>et al.</i> , 2009)
Bovina	Ácido peracético (0.1%) + Etanol (4-20%)	Queratocitos (sin especificar especie)	No	(Ponce Marquez <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Fosfolipasa A <sub>2</sub>	No	Queratoplastia lamelar anterior en conejo	(Wu <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Presión hidrostática ultraalta + DNase + Dextrano (3.5%)	No	Bolsillo intraestromal en conejo	(Sasaki <i>et al.</i> , 2009) (Hashimoto <i>et al.</i> , 2010)
Porcina	Triton X100 (1%)	No	Bolsillo intraestromal en conejo	(Sasaki <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	SDS (1%)	No	Bolsillo intraestromal en conejo	(Sasaki <i>et al.</i> , 2009)
Porcina	Triton X100 (1%)	Epitelio, queratocitos y endotelio de conejo	Bolsillo intraestromal en conejo	(Fu <i>et al.</i> , 2010)
Porcina	Suero humano 100%	No	No	(Shao <i>et al.</i> , 2010)
Porcina	SDS 0.5%	Epitelio y queratocitos de conejo	Bolsillo intraestromal en conejo	(Pang <i>et al.</i> , 2010)
Porcina	SDS 0.1%	No	No	(Gonzalez-Andrades <i>et al.</i> , 2010)
Porcina	NaCl 1.5M	Queratocitos humanos	No	(Gonzalez-Andrades <i>et al.</i> , 2010)

**Tabla 6:** Protocolos de descelularización aplicados a la córnea hasta la fecha.

### 4.3. INGENIERÍA TISULAR ONTOGÉNICA

Un concepto que aún hoy no se ha aplicado en la Ingeniería Tisular de la córnea, es la utilización del modelo de desarrollo embriológico. Aplicado ya en otros campos, como la Ingeniería Tisular odontológica, se ha conseguido desarrollar tejidos adultos imitando el desarrollo embriológico, generando la estructura e interacciones básicas entre tejidos embrionarios, que a priori, suelen ser menos complejas que las existentes en los tejidos adultos, aunque suelen ser tiempo dependientes (Yen and Sharpe, 2006). Los tejidos desarrollados in vitro a partir de este concepto se han basado en el estudio previo de las interacciones epitelio-mesénquima en torno al desarrollo embriológico del tejido en cuestión para poder reproducirlas en el laboratorio. No se ha de imitar por completo la cascada molecular implicada en dicho proceso sino los pasos estrictamente necesarios que marcan la diferenciación celular del tejido embriológico hacia el tejido adulto (Modino and Sharpe, 2005).

El desarrollo embriológico corneal aún está en ciernes. En el embrión humano, el epitelio corneal se forma a la sexta semana de gestación, a partir del ectodermo superficial que recubre el futuro cristalino que se desprenderá (American Academy of Ophthalmology., 2005). En esta etapa, la córnea consta de un epitelio de dos capas que se separa del endotelio por un espacio acelular, que conforma el estroma primario (Quantock and Young, 2008). El estroma corneal y el endotelio se originan a partir de las células mesenquimales derivadas de la cresta neural (Creuzet *et al.*, 2005), sin embargo, la morfogénesis de los tejidos derivados del mesénquima en la córnea humana no está clara todavía. Se han propuesto como teorías de la misma dos aproximaciones: la formación in situ a partir del tejido mesenquimal, así como olas de



migración de las células de la cresta neural que da lugar en tres oleadas distintas al iris, al endotelio corneal y a los queratocitos del estroma (Takacs *et al.*, 2009).





*“No hay cuestiones pequeñas;  
las que lo parecen son cuestiones  
grandes no comprendidas”.*

Ramón y Cajal



*Capítulo 2*

*JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS*



En la presente Tesis Doctoral se exponen distintos trabajos de investigación relacionados con la generación de dos modelos diferentes de córneas artificiales humanas (CAH): CAH basadas en constructos de Fibrina-Agarosa (CAH-FA) y CAH basadas en técnicas de descelularización-recelularización (CAH-DR).

A continuación enumeramos los objetivos generales y específicos de la Tesis Doctoral:

#### *Objetivo general*

Elaborar modelos de córnea artificial por Ingeniería Tisular para su potencial utilización en clínica.

#### *Objetivos específicos*

1. Aislar poblaciones de células corneales viables susceptibles de ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular para su posible uso terapéutico.
2. Determinar la viabilidad de las células endoteliales corneales responsables del mantenimiento de la homeostasis de la estructura corneal.
3. Elaborar un constructo de CAH mediante la utilización de biomateriales de fibrina y agarosa, y establecer sus patrones de calidad histológico y fisiológico.
4. Elaborar un constructo de CAH aplicando técnicas de descelularización-recelularización, y establecer sus patrones de calidad histológico y fisiológico.
5. Desarrollar un protocolo de ensayo clínico para la aplicación de la córnea artificial como medicamento de Terapias Avanzadas.



*“Si no conozco una cosa,  
la investigaré”.*

L. Pasteur



Capítulo 3  
RELACION DE ARTÍCULOS  
Y TRABAJOS CIENTÍFICOS





**RELACIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS**

- González Andrades M, Ingrid Garzón, Rosa Bellido, José Ignacio Muñoz-Ávila. Aislamiento de células epiteliales corneales a partir del limbo esclerocorneal humano. *Actualidad Médica*. 2009; 777(94):8-13.
- Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, García JM, Crespo PV, González-Andrades M, Campos A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *Journal of Cell Physiology*. 2007; 211(3):692-698.
- Alaminos M, González-Andrades M, Muñoz-Ávila JI, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Campos A. Volumetric and ionic regulation during the in vitro development of a corneal endothelial barrier. *Experimental Eye Research*. 2008; 86(5):758-769.
- González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 3(6):442-9.
- Ionescu AM, Cardona JC, González-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, Pérez MM. UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240-400nm Range. *Cornea*. 2010; 29(8):895-8.
- González-Andrades M, Cardona JC, Ionescu AM, Pérez MM, Campos A, Alaminos M. Generation of Bioengineered Corneas with Decellularized Xenografts and Human Keratocytes. *IOVS*. 2011; 52(1):215-22.
- Protocolo de ensayo clínico para la utilización de CAH-FA en seres humanos.



# Aislamiento de células epiteliales corneales a partir del limbo esclerocorneal humano

Miguel González Andrades (1,2), Ingrid Garzón (1), Rosa Bellido (2), José Ignacio Muñoz - Ávila (2)

1) Grupo de Ingeniería Tisular, Departamento de Histología de la Universidad de Granada, España

2) Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario San Cecilio de Granada, España

## Resumen

**Introducción:** La obtención de cultivos celulares epiteliales corneales humanos podría ser de gran utilidad tanto para la investigación básica como para su aplicación clínica en el tratamiento de diversas enfermedades corneales.

**Material y Métodos:** Muestras de limbo esclerocorneal procedentes de donante humano cadáver se pusieron en cultivo con medios específicos para células epiteliales con distintos factores de crecimiento. En la mitad de los cultivos se utilizaron células alimentadoras 3T3.

**Resultados:** Se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales corneales con un alto grado de proliferación, sin importar si el crecimiento se dio sobre células 3T3 o no. La tasa de contaminación de los cultivos fue menor en aquellos donde sí se encontraban estas células alimentadoras.

**Discusión:** La obtención de células epiteliales corneales es posible en el laboratorio a partir de pequeñas biopsias del limbo esclerocorneal tras su expansión en cultivo, utilizando una técnica de cultivo estándar, fácilmente reproducible.

**Palabras clave:** limbo esclerocorneal, ingeniería tisular, epitelio corneal, cultivos celulares.

## Abstract

**Introduction:** The achievement of human corneal epithelial cultures could be useful not only for research purposes, but also for clinical applications in the treatment of several corneal diseases.

**Material and Methods:** Sclerocorneal limbi were obtained from human donors and cultured in specific medium containing several hormones and growth factors. Half of the cultures were established using a layer of 3T3 feeder cells.

**Results:** we obtained primary cultures of corneal epithelial cells with a high proliferation rate in culture. No relationship with the use of a 3T3 feeder cell layer was found, but the likelihood of fibroblast contamination in the epithelial cultures was lower when these cells were used.

**Discussion:** Establishing primary cultures of corneal epithelial cells from small explants of limbal tissue is a technique that can be carried out in the laboratory using standard culture methods.

**Key words:** corneal limbus, tissue engineering, corneal epithelium, cell culture.

## 1. Introducción

El limbo esclerocorneal es una zona de transición entre la córnea y la esclerótica. Histológicamente, el epitelio del limbo es la zona que separa el epitelio columnar conjuntival del epitelio escamoso estratificado

de la córnea. El estroma corneal pierde aquí su transparencia, y sus láminas pierden su disposición ordenada, las fibras de colágeno aumentan de tamaño y su disposición es más parecida a las de la esclera (1).

Aunque el tamaño del limbo esclerocorneal es muy reducido, su papel es fundamental en la fisiología del polo anterior del globo ocular, cumpliendo para ello distintas funciones de las cuales destacamos las siguientes: nutrición de la córnea periférica, cicatrización corneal, regeneración del epitelio corneal, inmunovigilancia y respuestas de hipersensibilidad y función de barrera, para impedir que el tejido conectivo escleral y conjuntival alcance la córnea (1). Probablemente, la más importante de dichas funciones es la de actuar como reservorio de células madre del epitelio corneal y, por tanto, permitir la regeneración y mantenimiento de este epitelio; para ello, el limbo esclerocorneal presenta unas zonas especializadas con una rica vascularización e inervación, más prominentes en el limbo superior e inferior, denominadas "empalizadas limbares de Vogt" (2) en las cuales se origina el epitelio corneal a partir de las células basales de estas estructuras. Se trata de células madre de diferenciación epitelial (3) que están fuertemente unidas a la membrana basal (4). Estas células madre poseen una alta actividad mitótica, caracterizada por una división celular asimétrica.

Además, debido a su importante papel en el mantenimiento del epitelio corneal, cualquier patología que afecte al limbo esclerocorneal puede desembocar en un daño grave para el epitelio de la córnea. En concreto, el déficit de células madre limbares produce una inadecuada regeneración del epitelio corneal, provocando defectos epiteliales persistentes, y un fracaso de la barrera corneal, que se asocia a la invasión de la córnea por parte del epitelio conjuntival, pudiéndose acompañar posteriormente de una inflamación crónica con alteración de la transparencia corneal (5)(6).

En este contexto, el presente trabajo tiene por objeto describir un método para el aislamiento de células epiteliales a partir de limbos esclerocorneales obtenidos de donantes humanos. Para ello se procedió a la extracción de los mismos, aislándolos y cultivándolos para obtener cultivos celulares primarios de epitelio corneal, eventualmente útiles para la ingeniería tisular y otras aplicaciones biomédicas. En el trabajo evaluamos los efectos que genera la utilización o no de células alimentadoras en el desarrollo y mantenimiento de los cultivos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Obtención de córneas y limbos esclerocorneales

En este trabajo se utilizaron muestras de limbo esclerocorneal correspondientes a dos trasplantes de córnea de donante cadáver. Para el transporte, las muestras se mantuvieron en frío (4° C) en medio citoprotector estéril Optisol.

Las muestras de limbo se procesaron durante las 6 horas posteriores a su llegada al laboratorio para asegurar una elevada supervivencia celular y tisular. Se lavaron 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 o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

A continuación, los limbos esclerocorneales se examinaron bajo visión microscópica, para eliminar cualquier resto de conjuntiva, iris u otros tejidos que pudiesen contaminar o impedir el crecimiento de las células epiteliales corneales.

### 2.2 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales corneales

Para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales, los limbos esclerocorneales se dividieron cada uno, en seis pequeños explantes de alrededor de 2 X 2 mm<sup>2</sup> y 100 µm de espesor mediante fragmentación mecánica de los mismos en condiciones de esterilidad. Para favorecer la adhesión de los explantes limbares a las superficies de cultivo, dichos explantes se depositaron con el epitelio en contacto directo con la superficie de frascos de cultivo estériles de 25 cm<sup>2</sup>, desprovistos de medio de cultivo. Quince minutos más tarde, cuando los explantes se adhirieron 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 esclerocorneal 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, según se detalla a continuación:

En primer lugar, se empleó medio de cultivo selectivo para células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales corneales sobre los fibroblastos y los queratocitos. El medio consistió en dos partes de medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinhem, Alemania) y una parte de medio Ham F-12 (Sigma-Aldrich Ref. N6658). Además se le añadió suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinhem, Alemania), adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795), 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 estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B) y factores de crecimiento para células epiteliales en cultivo: insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. I2767), triiodotironina (1.3 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. T5516), toxina colérica (8 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. C3012), hidrocortisona (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. H0888) y factor de crecimiento epidérmico EGF (10 ng/ml) (Becton-Dickinson Ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU).

En segundo lugar, la mitad de los explantes esclerocorneales se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie que contenían una capa de células alimentadoras 3T3 (ECACC 85022108) inactivadas a una densidad de 8-10 × 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>. La inactivación de las células 3T3 se llevo a cabo mediante irradiación (6.000 rads) o mediante tratamiento con mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. M4287, Saint Quentin-Fallavier, Francia) durante 2 horas a 37°C. En la otra mitad de los casos, se prescindió de esta capa de células alimentadoras, cultivándose los explantes esclerocorneales directamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

Posteriormente, las células se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días.

### 2.3 Análisis estadístico

Para la comparación de tasas de crecimiento correspondientes a métodos de cultivo celular, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para la identificación de diferencias entre diferentes porcentajes, se usó el test exacto de Fisher. En todos los casos, se seleccionó un valor de

significación  $\alpha$  del 5% como nivel de significación estadística para los tests de doble cola.

## 3. Resultados

Las células de epitelio corneal se obtuvieron a partir de explantes tisulares de limbo esclerocorneal humano, los cuales se cultivaron usando medios y técnicas de cultivo celular estándar. Los explantes limbares se cultivaron directamente sobre frascos de cultivo en presencia o ausencia de células de soporte 3T3 inactivadas.

En ausencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células de epitelio corneal tienden a migrar desde el explante (fig. 1A) alrededor del 5º día de cultivo, para alcanzar la confluencia y formar una monocapa de células después de 17,5 días de cultivo (17,5 ± 2,5 días) (fig. 1C). En presencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células epiteliales corneales comienzan a desplazar a las células alimentadoras y a adherirse a la superficie del cultivo alrededor del 7º día de cultivo (fig. 1B), alcanzando la confluencia en 29,5 días (29,5 ± 1,5 días) (fig. 1D). Una vez cultivadas, las células de epitelio corneal muestran una morfología típica poliédrica (fig. 1B). A diferencia de los resultados obtenidos y publicados por otros autores (7), que refieren un crecimiento más rápido de las células epiteliales cuando éstas son cultivadas con células 3T3, las diferencias en nuestro estudio no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$  para la prueba U de Mann-Whitney), por lo que la tasa de proliferación de las células epiteliales fue similar en ambos grupos (con o sin células alimentadoras de soporte). No obstante, el uso de la capa alimentadora previno la contaminación estromal del cultivo de epitelio, que apareció en el 40% de los casos en los que las células epiteliales se cocultivaron con las células 3T3, mientras que esta contaminación se detectó en el 80% de los cultivos sin la capa alimentadora. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para el test exacto de Fisher ( $p < 0.001$ ).

## 4. Discusión

La obtención de cultivos celulares primarios a partir de muestras de limbo esclerocorneal humano presenta una gran utilidad, tanto en investigación básica, como en clínica (8).

Desde años atrás, se han intentado mantener en cultivo distintos tipos de estirpes celulares no neoplásicas, con la dificultad que supone el hecho de que las células euplálicas presenten un crecimiento limitado a varias generaciones. Durante las dos últimas décadas, se ha avanzado notablemente en el cultivo de células epiteliales procedentes del limbo esclerocorneal humano, aunque el cultivo celular a partir de biopsias del mismo aún presenta dificultades (9)(10)(11).

En el presente trabajo, se describe una técnica para la obtención de cultivos celulares primarios a partir de explantes de limbo esclerocorneal humano. El método llevado a cabo por nuestro grupo es una modificación de la metodología propuesta inicialmente por Ebato et al (12) para el cultivo de células epiteliales corneales, y modificado posteriormente por varios autores (13). Mediante esta técnica, hemos conseguido individualizar con éxito una de las principales estirpes celulares existentes en la córnea, concretamente, células epiteliales corneales.

Las posibles aplicaciones de estas células humanas mantenidas en cultivo procedentes del limbo esclerocorneal son múltiples. Por un lado, el estudio de la ultraestructura (14) de una de las principales células que constituyen la córnea, se puede llevar a cabo utilizando estas células de gran capacidad proliferativa. Por otro lado, los estudios funcionales, farmacológicos o de expresión génica, son muy difíciles de llevar a cabo en biopsias corneales o limbares de pequeño tamaño, por lo que la posibilidad de contar con una cantidad prácticamente ilimitada de células puede abrir nuevas perspectivas en estos campos (15)(16)(17). Finalmente, disponer de uno de los principales componentes celulares de la córnea posibilita la fabricación de tejidos vivos en el laboratorio para su eventual uso en oftalmología (18)(19), no sólo para su utilización en la construcción de córneas biológicas organotípicas mediante ingeniería tisular, sino, además, abre nuevos campos de investigación relacionados con el tratamiento de la patología de la superficie ocular, incluyendo implantes de células expandidas ex

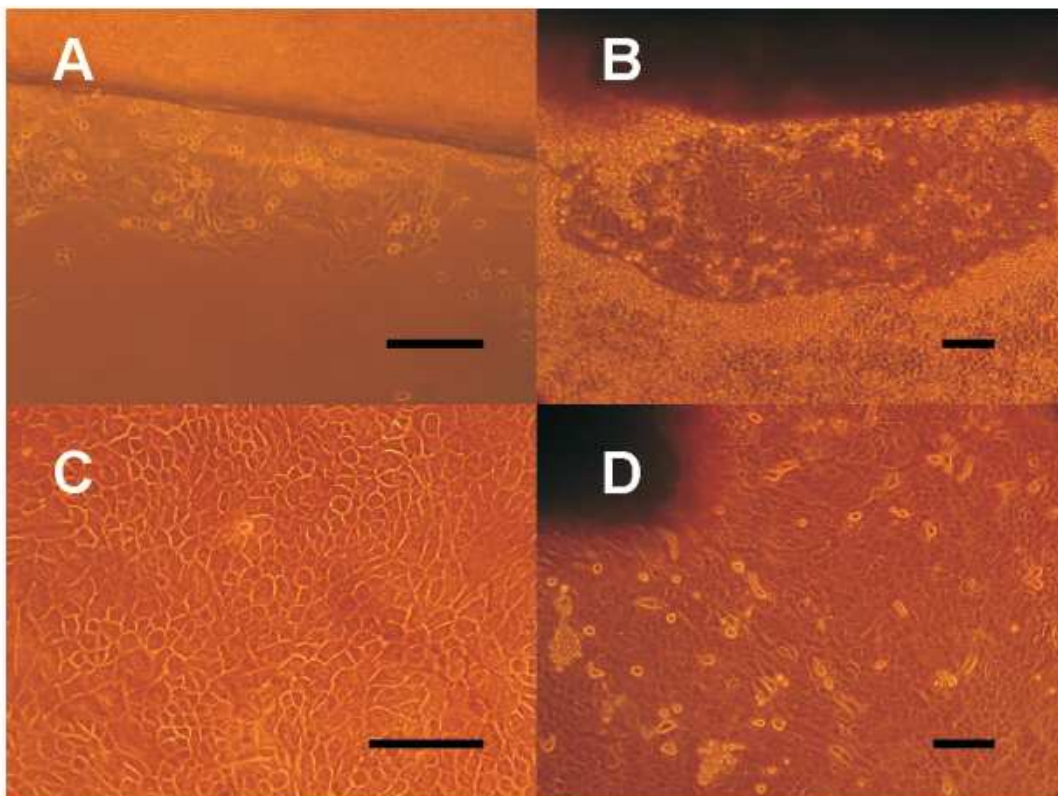


Figura 1: Imágenes de microscopía óptica de contraste de fase, de cultivos de epitelio corneal humano: inicialmente, las células epiteliales crecen a partir del explante de limbo esclerocorneal, formando una isla (fig. A, sin células alimentadoras 3T3) que desplaza a las células de soporte 3T3 cuando estas se utilizaron en el cultivo (fig. B). Tras varios días de cultivo, las células alcanzaron su confluencia tanto en ausencia (fig. C) como en presencia de células 3T3 (fig. D). Escala: 200µm.

vivo con o sin la utilización de soportes de membrana amniótica (20)(21)(22), etc. En este sentido, los grandes avances experimentados en la ingeniería tisular han permitido construir tejidos como la piel, el urotelio, la mucosa oral y la córnea (10)(18)(23).

La técnica que desarrollamos en el presente trabajo, basada en el cultivo de explantes de limbo esclerocorneal, demostró una elevada eficiencia a la hora de generar cultivos celulares confluentes. Frente a otras técnicas más complejas basadas en la individualización de las células madre del limbo esclerocorneal, la técnica de explantes es técnicamente sencilla y puede ser llevada a cabo incluso sobre fragmentos de tejido de muy reducido tamaño. De este modo, un pequeño fragmento de biopsia del limbo esclerocorneal podría generar un elevado número de células epiteliales corneales en un periodo de tiempo relativamente corto, gracias a la propagación y diferenciación de las células madre del limbo esclerocorneal (19).

Al mismo tiempo, el uso de una capa alimentadora de células previamente inactivadas (células 3T3 de embrión de ratón), se ha relacionado en estudios previos con una mayor tasa de proliferación en células de epitelio corneal cultivado, respecto a cultivos sin esta capa alimentadora (7)(24). Nuestros resultados, sin embargo, mostraron que las células de epitelio corneal presentan niveles de crecimiento similares con o sin la capa de células alimentadoras, aunque esta técnica de cultivo ayudó a evitar la eventual contaminación del cultivo por células estromales. Al mismo tiempo, la utilización de células y otros elementos de origen animal a nivel hospitalario en ensayos sobre humanos está muy restringida en la mayoría de los países por su posible transmisión de enfermedades xenobióticas (25). Por todo ello, creemos que la técnica de explantes de limbo esclerocorneal humano en la que no se utilizan células de soporte como ya han abogado otros grupos (26), es la más adecuada para la expansión en cultivo de células epiteliales corneales con fines biomédicos.

---

Financiado por: FIS 08/614

---

## Referencias

1. Kanski JJ. Oftalmología clínica. Elsevier: Madrid; 2002.
2. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80:155-171.
3. Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA. Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol* 2004; 48(8-9):981-91.
4. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44:415-425.
5. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006; 12:65-75.
6. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(27):9523-8.
7. Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesses C, Guerin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:497-527.
8. Griffith M, Watsky MA, Chia-Yang L, Trinkaus-Randall V. Epithelial cell culture: cornea. En Atala A, Lanza RB. *Methods of Tissue Engineering*. Academic Press: San Diego; 2001.
9. Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22, S28.
10. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosa epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351:1187-96.
11. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:5608.
12. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999; 97:891-986.
13. Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res* 2004; 79(1):41-9.
14. Bergmanson JP, Horne J, Doughty MJ, Garcia M, Gondo M. Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens* 2005; 31(6):281-7.
15. McCanna DJ, Harrington KL, Driot JY, Ward KW, Tchao R. 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.
16. Castro-Muñozledo F. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Exp Eye Res* 2008; 86(3):459-69.
17. Reichl S. Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60(3):299-307.
18. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(8):3311-7.
19. Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA, Germain L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2009; 482:233-56.
20. Kim MK, Heo JW, Lee JL, Wee WR, Lee JH. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after in vivo transplantation. *Curr Eye Res* 2005; 30(8):639-46.
21. Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(12):1437-9
22. Ma DH, Yao JY, Yeh LK, Liang ST, See LC, Chen



HT 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):2586-95.

23. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(5):1113-25.

24. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006; 12:65-75.

25. Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* 2007; 2(6):919-27.

26. Higa K, Shimazaki J. Recent advances in cultivated epithelial transplantation. *Cornea* 2008; 27(S1):S41-7.

# Evaluation of the Viability of Cultured Corneal Endothelial Cells by Quantitative Electron Probe X-Ray Microanalysis

M. ALAMINOS,<sup>1,2\*</sup> M.C. SANCHEZ-QUEVEDO,<sup>1</sup> J.I. MUÑOZ-ÁVILA,<sup>3</sup> J.M. GARCÍA,<sup>1</sup> P.V. CRESPO,<sup>1</sup> M. GONZÁLEZ-ANDRADES,<sup>1</sup> AND A. CAMPOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology, University of Granada, Spain

<sup>2</sup>Fundación Hospital Clínico, Granada, Spain

<sup>3</sup>Division of Ophthalmology, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

Construction of artificial organs and tissues by tissue engineering is strongly dependent on the availability of viable cells. For that reason, the viability and the physiological status of cells kept in culture must be evaluated before the cells can be used for clinical purposes. In this work, we determined the viability of isolated rabbit corneal endothelial cells by trypan blue staining and quantitative electron probe X-ray microanalysis. Our results showed that the ionic content of potassium in cultured corneal endothelial cells tended to rise initially, but significantly decreased in cells in the fifth (and final) subculture, especially in comparison to cells in the fourth subculture ( $P < 0.001$ ). However, the concentration of sulfur was higher in the fifth subculture than in the fourth subculture ( $P < 0.001$ ), with a nonsignificant increase in sodium in the fifth subculture ( $P = 0.031$ ). These data imply a remarkable decrease in the K/Na ratio from the fourth to the fifth subculture. Our microanalytical results, along with the morphological differences between cells in the last two subcultures, are compatible with an early phase of the preapoptotic process in the fifth subculture, and suggest that cells of the first four subcultures would be better candidates for tissue engineering.

J. Cell. Physiol. 211: 692–698, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

As a transparent structure, the cornea is a specialized organ that plays an important role in the transmission of light to the retina. The histological structure of the cornea allows it to serve as a barrier to the outside environment and as a major element in the optical pathway of the eye (Griffith et al., 1999). This organ comprises three major cell layers: the outermost stratified epithelium, the stroma containing keratocytes, and the innermost corneal endothelium. The corneal endothelium is a single layer of specialized epithelium with an important physiological function in the regulation of sodium and potassium concentration in the anterior pole of the eye. This mechanism of regulation is able to control the level of hydration of the cornea (Bonanno, 2003).

The construction of artificial organs by tissue engineering is one of the fields of medical research that has experienced major progress in recent years (Atala, 2000). Different groups have tried to develop an efficient substitute for the cornea with tissue engineering techniques, although the *ex vivo* culture of human corneal endothelial cells is still a challenge for most of the researchers (Tegtmeyer et al., 2001; Joyce, 2003). In this context, our research group has recently developed an efficient physiological model of the rabbit cornea by tissue engineering (Alaminos et al., 2006). In this regard, it is important to evaluate the viability of cultured cells before they can be used to produce artificial organs and tissues by tissue engineering, since only viable cells are suitable for clinical use. This is important not only in human tissue engineering, but also in the construction of animal models (Tegtmeyer et al., 2001).

Evaluating the viability of the cultured cells, however, is not easy, and different approaches have been proposed. A number of methods focus on the detection of permeability alterations in the cell membrane by trypan blue or propidium iodide staining, or by quantifying lactic dehydrogenase (LDH) in the culture medium (Bouillaguet et al., 2000; Chen and Wagner, 2001). However, most of these techniques are not accurate enough to detect early cell damage, but only identify cell alterations once they have become irreversible. In most cases a positive result

with these techniques reveals that the integrity of the cell membrane has been lost. For these reasons, such methods cannot detect cells that are prone to death but do not yet manifest cell membrane alterations.

On the other hand, one of the most sensitive techniques for determining the viability of cultured cells is quantification of the ionic content, especially potassium and sodium (Zierold, 1997; Fernandez-Segura et al., 1999; Roomans, 1999; Roomans, 2002). Indeed, the intracellular concentration of these ions correlates well with the vital status of cells and is an excellent marker of cell physiology and cell viability. Electron probe X-ray microanalysis associated with electron microscopy is the most powerful approach to measure total elemental composition, making it possible to simultaneously determine the concentrations of different elements and the ultrastructure of cells (Buja et al., 1985; Hall, 1988; Somlyo et al., 1989; Krep et al., 1996; Warley, 1997; Vanthanhovong et al., 2003). By using this combined biochemical and morphological technique, our group has previously quantified the ionic content of different cell lines including U937 (Fernandez-Segura et al., 1999; Arrebola et al., 2005), MCF7 (Fernandez-Segura et al., 1997) and K562 cells (Warley et al., 1994), and others have measured the mineral

Contract grant sponsor: Spanish National Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III);

Contract grant numbers: FIS 03/141, FIS 04/1983.

Contract grant sponsor: Junta de Andalucía;

Contract grant number: CM2005/011.

\*Correspondence to: Dr. M. Alaminos, Department of Histology, University of Granada, Avenida de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain. E-mail: malaminos@histolii.ugr.es

Received 23 September 2006; Accepted 14 November 2006

DOI: 10.1002/jcp.20976

concentrations of different layers of the healthy cornea in situ (Schrage et al., 1993). However, the microanalytical profile of isolated corneal endothelial cells kept in culture has not been described to date. Some authors have used histological and morphological methods, and suggested that cultured corneal cells in the fourth subculture may be the most appropriate for tissue engineering (Zhu and Joyce, 2004). However, the microanalytical composition of cells from different subcultures has not been established to date.

In this work we investigated the local content of several key elements (sodium, magnesium, phosphorus, chlorine, potassium, sulfur, and calcium) in isolated corneal endothelial cells kept in culture. Cell viability in each subculture was assessed with quantitative electron probe X-ray microanalysis, a method that holds considerable potential for the evaluation of cultured cells to determine the most suitable subculture for harvesting corneal cells to be used in tissue engineering.

## Materials and Methods

### Rabbit corneas

Ten rabbit corneas were obtained from five adult New Zealand white rabbits weighting approximately 2 kg. All procedures were carried out in animals killed by lethal intracardiac injection of potassium chloride under general anesthesia. Immediately thereafter, whole corneas were extracted under a surgical microscope and preserved at 4°C in RPMI culture medium supplemented with penicillin, streptomycin, and antimycotics (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ref. #A5955). All corneas were processed within 6 h after extraction.

This research was approved by the institutional experimentation committee, and all animals were treated according to national and international guidelines on animal welfare.

### Isolation and culture of corneal endothelial cells

To obtain endothelial cells, the inner side of each cornea was treated with trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) and corneas were incubated for 10 min at 37°C. Then the endothelial cells attached to Descemet's layer of the corneas were mechanically dissected under surgical microscope. All cells were cultured in 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich), 4 mM L-glutamine, 1% antibiotic solution (Gibco BRL) and different growth factors: insulin (5 mg/ml), triiodothyronine (1.3 ng/ml), cholera toxin (8 ng/ml), and hydrocortisone (0.4 mg/ml) (Alaminos et al., 2006). The medium was changed once every 3 days. Subculture of the corneal endothelial cells was carried out with trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution on subconfluent cell cultures. The cells were kept in culture up to the fifth subculture.

The percentages of dead and live cells were found by staining the trypsinized cells with trypan blue and counting the number of blue cells under light microscope. All counts were done in triplicate, and the mean and standard deviation were calculated for each subculture.

To establish the microanalytical pattern of the cells, we decided to use five passages since it was previously suggested that corneal cells kept in culture could begin to display morphological changes compatible with early senescence starting from passages four or five (Zhu and Joyce, 2004).

### Identification of endothelial cells by RT-PCR

To confirm that the cultured cells were of endothelial origin, we examined the culture daily under a phase contrast microscope, and determined the expression level of the genes *KRT12* (keratin 12) and *COL8* (collagen VIII) by RT-PCR according to previously published protocols (Alaminos et al., 2006). Briefly, total RNA from

cultured cells was extracted and purified with the QIAgen, Mississauga, Ontario, Canada RNeasy Mini Kit (ref. #74106). The quality of the RNA was assessed by optical inspection in agarose gels under denaturing conditions. Two micrograms of DNA were reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and amplified using specific primers for *KRT12* 5'-GAACTGGGACTGCAGATGCTT-3' (forward) and 5'-TTCAGGCTCTCGATCTGCATC-3' (reverse) and for *COL8* 5'-CATGCAGAAAGGACCTGTGG-3' (forward) and 5'-TCCTGGCTTTCCCATGCCT-3' (reverse). PCR was carried out for 35 cycles (95°C for 30 sec, 52°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec) in a volume of 25 µl with a final concentration of 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mmol/L deoxynucleotide triphosphate, 0.25 mmol/L of each primer and two units of Taq polymerase (Life Technologies) in 1× reaction buffer. Specific primers for the *GAPDH* gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were used under the same conditions as in control assays to ensure cDNA quality and loading accuracy. PCR-amplified products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

### Electron probe X-ray microanalysis

For X-ray microanalysis, subconfluent endothelial cells were subcultured using trypsin-EDTA on plated gold grids covered with a thin layer of Pioloform (polyvinyl butyral) (Ted Pella, Inc., Redding, CA) and sterilized overnight under UV light. Cells were seeded at a density of 5,000 cells per grid and cultured in DMEM supplemented with 10% serum, antibiotics and growth factors. After 24 h of culture on the gold grids covered with Pioloform, support grids containing the endothelial cells were washed in ice-cold distilled water for 5 sec to remove the extracellular medium. After washing, excess water was drained from the surface and the grids were immediately plunge-frozen in liquid nitrogen (Abraham et al., 1985; Warley, 1994). After cryofixation, the grids were placed in a precooled aluminum specimen holder at liquid nitrogen temperature and freeze-dried at increasing temperatures for 24 h in an E5300 Polaron freezer-drier apparatus equipped with a vacuum rotatory pump system. Freeze-dried gold grids were carbon-coated in a high-vacuum coating system and microanalyzed within 6 h.

Electron probe X-ray microanalysis of the specimens was performed with a Philips XL30 scanning electron microscope (SEM) equipped with an EDAX DX-4 microanalytical system and a solid-state backscattered electron detector. The samples were examined with SEM with a combination of secondary electron (SE) and backscattered electron (BSE) imaging modes.

For X-ray microanalysis, the analytical conditions were: tilt angle 0°, take-off angle 61.34° and working distance 10 mm. The acceleration voltage was 10 kV. All spectra were collected in the spot mode at 10,000× (equivalent to 50 nm spot diameter) for 200 sec live time, and the number of counts per second recorded by the detector was around 500. All determinations were performed on the central area of the cell nucleus. To determine total ion content, we used the peak-to-local-background (P/B) ratio method (Statham and Pawley, 1978; Boekestein et al., 1984; Fernandez-Segura et al., 1997) with reference to standards composed of 20% dextran containing known amounts of inorganic salts (Warley, 1990).

In all, we quantified the ionic content of 60 cultured corneal endothelial cells in each subculture corresponding to three different grids and three different culture flasks from the same subculture.

### Morphological study of isolated corneal endothelial cells

Carbon-coated specimens were analyzed with the same Philips XL30 scanning electron microscopy that was used for microanalysis. This methodology allows synchronic morphological

observation of the cells at the same time as microanalysis. Then the same cells were coated with gold and inspected with the SEM.

#### Statistical analysis

To evaluate the statistical significance of the differences between mean values for two consecutive subcultures, we used the nonparametric Mann–Whitney test. Comparisons of several subcultures at a time were carried out with the Kruskal–Wallis test for multiples samples. To compare percentages of dead cells between different subcultures, we used Fisher's exact test. For individual tests, a two-sided *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant. For multiple comparisons, a Bonferroni-adjusted significance level of 0.001 was considered significant because up to 50 statistical tests were used at the same time.

## Results

### Culture of rabbit corneal endothelial cells

Isolated endothelial cells proliferated rapidly in culture starting from day 5 (mean  $5.1 \pm 2.3$  days), and reached subconfluency around day 9 ( $8.9 \pm 3.3$  days). In culture, endothelial cells displayed a variable polygonal shape (Fig. 1) rather than their typical hexagonal shape in the original cornea. In trypsinized cells, trypan blue staining demonstrated that most of the cells in the first subcultures were alive ( $91 \pm 1.5\%$  for the first subculture,  $94 \pm 2\%$  for the second,  $94 \pm 0.5\%$  for the third, and  $95 \pm 1\%$  for the fourth subculture), and that the percentage of live cells was slightly lower in the fifth subculture ( $92 \pm 1.5\%$ ). Differences between the different subcultures were not statistically significant ( $P > 0.05$ , Fisher's exact test for all

comparisons between different subcultures). No morphological differences were found under light microscope between cells belonging to different passages.

### Cultured cells overexpressed specific genes

As expected, RT-PCR analysis demonstrated that in cultured corneal endothelial cells, there was relative overexpression of the *COL8* gene, which encoded for collagen VIII. This gene is selectively expressed by vascular endothelia and corneal endothelial cells, but not by stromal or epithelial cells (Muragaki et al., 1991). However, the *KRT12* gene (keratin 12), whose expression is specific for epithelial cells of the cornea (Liu et al., 1999, Wang et al., 2002), was not expressed in cultured corneal endothelial cells (Fig. 1). The housekeeping control gene *GAPDH* was highly expressed in all cultured corneal cells.

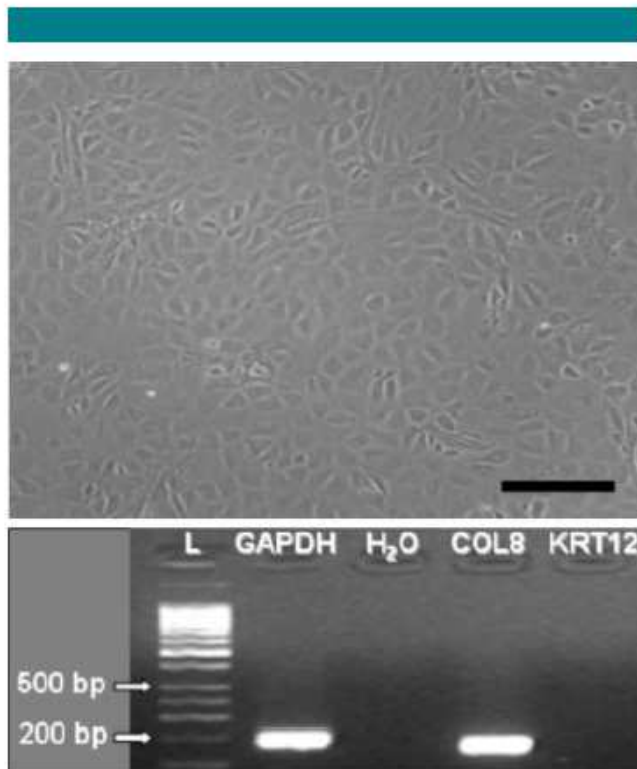
### Ionic content of cultured endothelial cells

Analyses of 60 endothelial cells from each subculture showed that cultured corneal endothelial cells were characterized in general by a high K/Na ratios, ranging from 6.94 for the fifth subculture to 10.69 for the third subculture (Table 1). Illustrative examples of spectra corresponding to cells from different subcultures are shown in Figure 2.

When the microanalytical results were compared among the five subcultures with the Kruskal–Wallis test for multiple samples, significant differences were found for Na, K, Mg, P, Cl, and S ( $P < 0.001$  for each element) but not for Ca ( $P > 0.01$ ) (Table 2). These data suggest that the concentrations of these elements did not remain constant across subcultures, but varied depending on the passage. One-to-one statistical comparisons between consecutive passages demonstrated a tendency for several elements to increase or decrease in intracellular concentration in later subcultures compared to the earlier passages. For example, the concentration of potassium tended to increase in the first three subcultures, reaching maximum values in the third subculture and decreasing thereafter. As shown in Table 2, the increase between the second and the third subcultures as well as the decrease between the last two subcultures were statistically significant ( $P < 0.001$ , Mann–Whitney test). In contrast, the concentration of sodium tended to increase from the first to the last subculture, although the differences were only marginally significant when we compared the first versus the second subculture ( $P = 0.014$ ), the second versus the third subculture ( $P = 0.021$ ), and the fourth versus the last subculture ( $P = 0.031$ ). The data for chlorine showed that the cell concentration of this element tended to decrease from the first to the second passage, significantly increasing in the third subculture and decreasing thereafter. On the other hand, the intracellular levels of sulfur tended to increase with successive passages, but decreased in the fourth subculture, with significant differences between the first two subcultures and between the last two cell passages. Phosphorous and magnesium displayed less dramatic changes across the different subcultures, with significant increases only between the first and the second subcultures. In general, the percentage of cells with a high potassium and chlorine content was higher in the fourth subculture than in the fifth subculture, whereas the percentage of cells with a high sodium and sulfur content was lower (Fig. 3).

### Morphological analysis of isolated corneal endothelial cells

In general, corneal endothelial cells kept in culture tended to display a polygonal shape rather than the typical hexagonal outline of cells in native corneas. As shown in Figure 4, corneal endothelial cells in the first subcultures tended to present morphological similarities to native corneal endothelial cells in



**Fig. 1.** Corneal endothelial cells used in this work. Top panel: Phase contrast micrograph of confluent isolated corneal endothelial cells corresponding to the fourth subculture. Scale bar: 200  $\mu$ m. Lower panel: Collagen 8 (*COL8*) and keratin 12 (*KRT12*) RNA expression in the same cells by reverse transcription PCR. Expression of the *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was used as a control for RNA loading. L: 1-kb ladder used as a molecular weight control for the amplified products.

TABLE 1. Average intracellular concentrations of ions analyzed in isolated corneal endothelial cells from subcultures one to five

Subculture	Calcium	Chlorine	Magnesium	Phosphorus	Potassium	Sodium	Sulfur
1	12.24 ± 1.07	85.00 ± 3.52	14.89 ± 0.47	221.31 ± 5.39	288.15 ± 9.24	28.97 ± 1.52	42.95 ± 1.59
2	11.25 ± 1.19	68.29 ± 3.59	18.80 ± 0.70	305.44 ± 5.58	318.92 ± 11.02	35.25 ± 1.74	55.06 ± 2.32
3	12.34 ± 0.89	135.39 ± 4.53	21.88 ± 0.68	288.70 ± 4.09	422.04 ± 11.63	39.48 ± 1.68	56.61 ± 4.21
4	12.09 ± 1.29	104.15 ± 4.30	20.64 ± 0.67	290.84 ± 3.96	403.86 ± 10.87	42.37 ± 2.52	41.11 ± 1.78
5	13.31 ± 0.90	87.41 ± 5.00	19.62 ± 0.87	302.80 ± 5.48	336.41 ± 10.87	48.46 ± 2.86	58.78 ± 2.17

All concentrations (in mmol/kg dry weight) are expressed as mean ± standard error (SE).

vivo, with a polygonal, slightly elongated and generally uniform shape. In contrast, cells in the fifth passage tended to show a more rounded and semispherical silhouette. The cell surface became more heterogeneous in the fifth subculture than in the fourth passage.

### Discussion

Quantitative energy dispersive X-ray microanalysis (EDXA) with electron microscopy is a well established procedure to evaluate the viability and the physiological status of cultured cells, especially when these cells are intended for clinical purposes or the construction of tissue equivalents by tissue engineering (Fernandez-Segura et al., 1999). In contrast with other methods based on the exclusion of dyes such as trypan blue or propidium iodide (Bouillaguet et al., 2000; Chen and Wagner, 2001), EDXA is a highly sensitive technique for determining cell viability. Previous studies by our group have demonstrated a strong correlation between the morphological changes that take place in cells during death and the intracellular levels of different ionic components in human U937 cells (Fernandez-Segura et al., 1999; Arrebola et al., 2005), K562 cells (Warley et al., 1994), and MCF7 cells (Fernandez-Segura et al., 1997).

It is well known that close control of the intracellular levels of different ions is critical for most cell physiological functions. For certain organs including the cornea, tissue levels of hydration must be strictly controlled and regulated (Kostyuk et al., 2002). In the cornea, maintaining transparency of the visual pathway is strongly dependent of the levels of hydration of the corneal stroma. Under normal conditions the corneal stroma shows a strong tendency to swell due to the presence of abundant nondiffusible, negatively charged molecules such as glycosaminoglycans (Hodson, 1997; Fischbarg and Maurice,

2004). However, the water balance is kept under control by an active process of ion transport (especially chlorine, sodium, and potassium) across the corneal endothelium (Maurice, 1984; Bonanno, 2003). Ion transport across the endothelium is thought to involve the active transport of anions from the corneal stroma towards the aqueous humor, followed by the mainly passive diffusion of cations (Bonanno, 2003; Davies et al., 2004). Thus the endothelium is able to counterbalance the continuous leak of fluid into the corneal stroma and avoid the stromal imbibition and edema that would impair vision (Kostyuk et al., 2002; Bonanno, 2003; Davies et al., 2004). With a view to possible clinical applications, information about the intracellular concentration of anions and cations in corneal endothelial cells is important to determine the vital and functional status of cultured endothelial cells. We therefore suggest that the ionic content of sodium, potassium, chlorine, phosphorous, and other elements should be quantified in corneal endothelial cells intended for clinical use, tissue engineering or in vitro testing of toxics and drugs. This would guarantee the use of only viable and fully functional cells. However, reports of normal elemental concentrations in native corneas or cultured corneal cells are rare, and elements in the corneal endothelium have thus far only been identified in homogenates (Schrage et al., 1993) and ultrathin sections of the normal cornea (Langefeld et al., 1997). Consequently, little is known about the normal ionic content of cultured corneal endothelial cells.

It was previously shown that cell cultures tend to age and lose viability after several passages (Balconi and Dejana, 1986). Some researchers recently reported that corneal endothelial cell cultures displayed evident morphological changes starting from the fourth passage, with a trend for cells to enlarge with increasing passage number (Zhu and Joyce, 2004). According to these authors, morphological changes were associated with cell

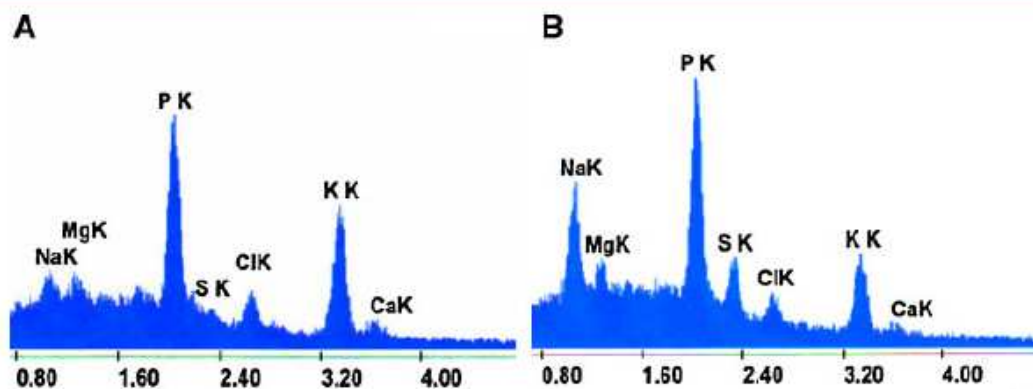


Fig. 2. Two examples of microanalytical spectra corresponding to a living cell in the third subculture (A) and to a dying cell in the fifth subculture (B). The peaks correspond to the energy dispersed by electrons located in the *k* orbitals of sodium (NaK), magnesium (MgK), phosphorus (PK), sulfur (SK), chlorine (ClK), potassium (KK), and calcium (CaK). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

TABLE 2. Significance (*P* values) of the differences in ion concentrations of calcium, chlorine, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, and sulfur in different subcultures

Comparison	Calcium	Chlorine	Magnesium	Phosphorous	Potassium	Sodium	Sulfur
1 vs. 2	N.S.	<i>P</i> = 0.003	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	N.S.	<i>P</i> = 0.014	<i>P</i> < 0.001
2 vs. 3	N.S.	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.004	<i>P</i> = 0.029	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.021	N.S.
3 vs. 4	N.S.	<i>P</i> < 0.001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<i>P</i> = 0.002
4 vs. 5	N.S.	<i>P</i> = 0.022	N.S.	N.S.	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.031	<i>P</i> < 0.001
All five subcultures	N.S.	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001

The Mann–Whitney test was used to compare ionic concentrations between the first versus second subculture, second versus third, third versus fourth or fourth versus fifth subculture, and the Kruskal–Wallis test was used to detect global differences among the five subcultures. *P* values less than 0.001 were considered significant. N.S.: *P* values > 0.05.

growth alterations and a high percentage of cell death (Zhu and Joyce, 2004). These findings were associated with increasing heterogeneity in cell shape and increasing numbers of multinucleated cells. Our results are in agreement with these reports, as cells in the fifth subculture contained a slightly higher number of dead cells than early subcultures (5% dead cells in the fourth subculture vs. 8% in the fifth), as determined by trypan blue staining. Although the differences were not dramatic when a classical staining method was used to determine cell mortality, our morphological and microanalytical data suggest that cells in the fifth subculture might have been in an early phase of cell death. In fact, we observed evident morphological alterations in cells in the fifth passage with scanning electron microscopy, whereas cells from earlier subcultures appeared to be morphologically normal.

Energy dispersive X-ray analysis allows both qualitative and quantitative determinations of the ionic elements that play a role in cell viability. This method has been extensively used to identify processes of cell death by necrosis or apoptosis in normal and pathological cells (Hongpaisan and Roomans, 1999;

Roomans, 1999, 2002). In this connection, different authors have identified ionic patterns that are highly specific for normal cells, apoptotic cells or necrotic cells. In general, experiments with cells undergoing induced necrosis showed rapid alterations in the intracellular concentration of calcium and, at a latter stage, an increase in the amount of chlorine and a reduction in the intracellular ATP available for different cell functions (Akar et al., 2003; McLaughlin et al., 2004; Salido et al., 2004). However, cells undergoing death by apoptosis showed a different pattern of ionic alterations: an increased concentration of sodium, and the depletion of potassium and chlorine (Fernandez-Segura et al., 1999; Skepper et al., 1999; Salido et al., 2004). Interestingly, although the ionic changes did not necessarily correlate with structural or morphological changes that appeared in the cells, the authors detected a good correlation between ionic changes and structural alterations in a model of induced apoptosis. However, ionic changes which can act as early markers of cell death are detectable in cells before morphological changes appear. Earlier studies have shown that the intracellular concentrations of sodium and

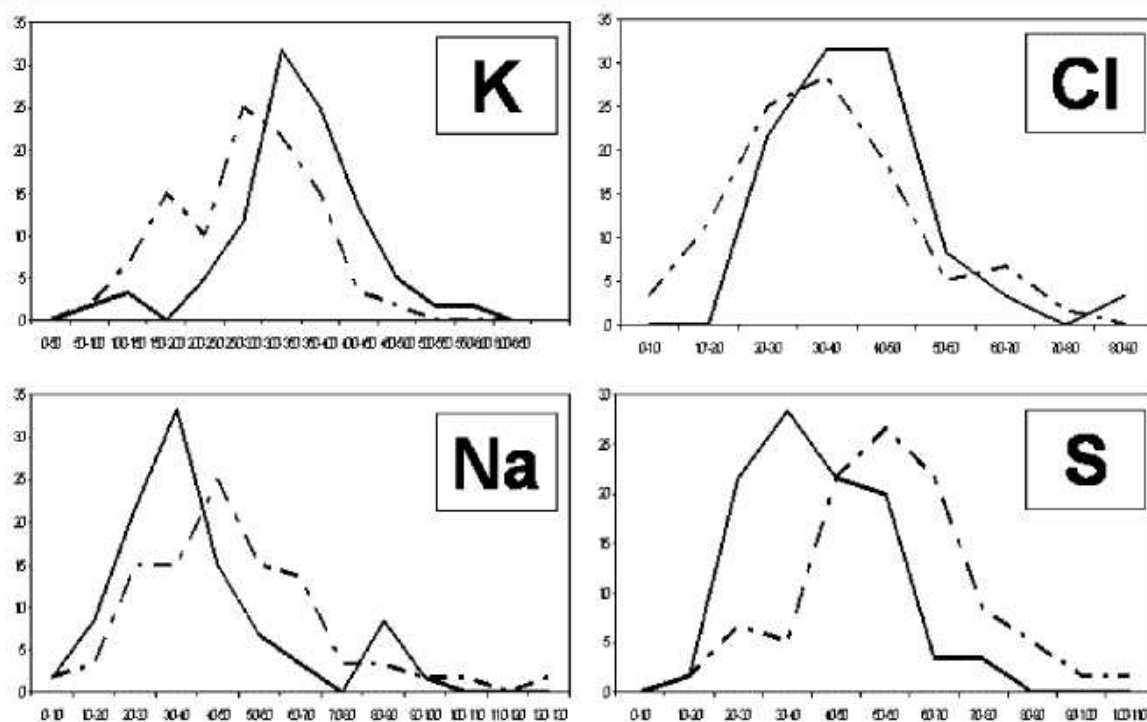
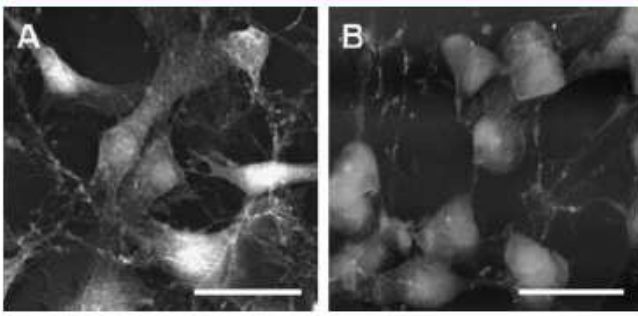


Fig. 3. Percentage of cells displaying different intracellular concentrations of sodium, potassium, chlorine, and sulfur in the fourth and fifth subcultures. The dotted lines represent ion concentrations in cells in the fifth subculture; continuous lines correspond to cells in the fourth subculture. For each element the X-axis represents intracellular ion concentration, and the Y-axis represents the percentage of cells with each concentration.



**Fig. 4.** Representative examples of cells in the second passage (A) and the fifth passage (B). Cells were grown on support grids, freeze-dried and carbon-coated before scanning electron microscopy (secondary electron mode). Cells from the first four subcultures were more regular and elongated than cells in the fifth subculture, which were more rounded. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

potassium are excellent markers of cell viability, and that the K/Na ratio is one of the most powerful parameters of cell damage from a microanalytical standpoint (Roomans, 2001). In this connection, our results demonstrated that intracellular levels of potassium tended to rise from the first to the second and third subculture, and to decrease thereafter, whereas sodium showed a clear tendency to increase from the first to the last subculture. These data suggest that cells in the last subculture might be less viable than those in the initial passages. In addition, cell levels of both potassium and chlorine decreased in corneal endothelial cells in the fifth subculture, whereas sodium and sulfur tended to increase in these cells. It is important to note that all microanalytical changes were synchronically observed *in situ* in the same cells that were observed for morphological analysis, and the correlation between morphological changes and ion concentrations was substantial. The substantial decrease of the K/Na ratio that we found in our cells is compatible with the changes described in preapoptotic cells as well as in the necrotic cell death (Fernandez-Segura et al., 1999). In this regard, (Zierold, 1997) demonstrated that the microanalytical changes that happen in cells undergoing necrotic cell death, are generally accompanied by a huge increase in the intracellular concentration of chlorine. In contrast, our results showed that cells at the last subculture tended to show a decrease in the intracellular concentration of chlorine. Different research groups showed that the major early predictor for apoptosis is the early decrease in both potassium and chlorine, reflecting cell shrinkage, and that this decrease in chlorine may be more important than that of potassium and could even act as a signal (Arrebola et al., 2006). Taken together, our microanalytical findings suggest that a number of the corneal endothelial cells in the fifth subculture might have been undergoing an early process of cell death by apoptosis.

On the other hand, the levels of magnesium did not vary between the last two passages in our cultures. Our findings suggest that the amount of ATP might have remained constant in the cells throughout all five subcultures, consistent with earlier research by Buja et al. (1985) and Di Francesco et al. (1998). These authors reported that a decrease in cell magnesium content was usually associated with a decrease in ATP levels under experimental conditions. This result is compatible with changes found in apoptotic and preapoptotic cells. The levels of sulfur, however, increased between the fourth and the fifth subcultures. This suggests that the concentration of sulfated glycosaminoglycans might begin to change during the fifth subculture (Sanchez-Quevedo et al.,

1989; Roomans, 2002), although it is also possible that the increase in sulfur at the later stages could reflect shrinkage of the corneal endothelial cells.

As suggested by earlier findings (Zhu and Joyce, 2004), our microanalytical and scanning electron microscopy results imply that although cell survival determined by trypan blue exclusion was high, corneal endothelial cells in the fifth subculture might have undergone a process of preapoptosis. These cells might not be good candidates for the construction of tissues and organs by tissue engineering. We propose that all cells to be used for clinical purposes be previously microanalyzed to determine their vital status and ensure a good rate of survival *in vivo*.

### Acknowledgments

The authors thank MA. Robles for her skillful technical assistance and K. Shashok for checking the use of English in the manuscript.

### Literature Cited

- Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C. 1985. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 248:154-164.
- Alar JG, Everett TH, Ho R, Craft J, Haines DE, Somlyo AP, Somlyo AV. 2003. Intracellular chloride accumulation and subcellular elemental distribution during atrial fibrillation. *Circulation* 107:1-6.
- Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. 2006. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3311-3317.
- Arrebola F, Zabiti S, Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernandez-Segura E. 2005. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 204:500-507.
- Arrebola F, Fernandez-Segura E, Campos A, Crespo PV, Skepper JN, Warley A. 2006. Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C638-C649.
- Atala A. 2000. Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 14:49-57.
- Balconi G, Dajana E. 1986. Cultivation of endothelial cells: Limitations and perspectives. *Med Biol* 64:231-245.
- Boekstein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A. 1984. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk/bio-organic sample. *J Microsc* 134:327-334.
- Bonanno JA. 2003. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 22:69-94.
- Boullaguet S, Wataha JC, Virgillito M, González L, Rakich DR, Meyer JM. 2000. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA 2-hydroxyethylmethacrylate on THP-1 human monocyte-macrophages, *in vitro*. *Dent Mater* 16:213-217.
- Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT. 1985. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab Invest* 53:397-411.
- Chen J, Wagner MC. 2001. Altered membrane-cytoskeleton linkage and membrane blebbing in energy-depleted renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:619-627.
- Davies N, Akhtar S, Turner HC, Candia OA, To CH, Guggenheim JA. 2004. Chloride channel gene expression in the rabbit cornea. *Mol Vis* 10:1028-1037.
- Di Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, Wolff FI, Romani A, Cittadini A, Bond M. 1998. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 360:149-157.
- Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. 1997. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 21:665-669.
- Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. 1999. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 253:454-462.
- Fischbarj J, Maurice DM. 2004. An update on corneal hydration control. *Exp Eye Res* 78:537-541.
- Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, Hakim M, Song Y, Watsky MA. 1999. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286:2169-2172.
- Hall TA. 1988. Capabilities and limitations of probe methods for the microanalysis of chemical elements in biology: A brief introduction. *Ultramicroscopy* 24:181-184.
- Hodson SA. 1997. Corneal stromal swelling. *Prog Retin Eye Res* 16:99-116.
- Hongpaisan J, Roomans GM. 1999. Retaining ionic concentrations during *in vitro* storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc* 193:257-267.
- Joyce NC. 2003. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 22:359-389.
- Kostyuk O, Nalovina O, Mubard TM, Regini JW, Meek KM, Quantock AJ, Elliott GF, Hodson SA. 2002. Transparency of the bovine corneal stroma at physiological hydration and its dependence on concentration of the ambient anion. *J Physiol* 543:633-642.
- Krep H, Lefurgey A, Graves SW, Hockett D, Ingram P, Hollenberg NK. 1996. Elemental composition of Na pump inhibited rabbit aorta VSM cells by electron probe X-ray microanalysis. *Am J Physiol* 271:514-520.
- Langefeld S, Reim M, Redbrake C, Schrage NF. 1997. The corneal stroma: An inhomogeneous structure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:480-485.
- Liu JJ, Kao WW, Wilson SE. 1999. Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res* 68:295-301.
- Maurice DM. 1984. The cornea and sclera. In: Dawson H, editor. *The eye*. Orlando, California: Academic Press, pp 1-158.

- McLaughlin CW, Zellhuber-McMillan S, Macknight AD, Civan MM. 2004. Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:1376–1389.
- Munagaki Y, Mattei M-G, Yamaguchi N, Olsen BR, Ninomiya Y. 1991. The complete primary structure of the human alpha-1VIII chain and assignment of its gene COL8A1 to chromosome 3. *Eur J Biochem* 197:615–622.
- Roomans GM. 1999. X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and the scanning transmission electron microscope: A comparison. *Scanning Microsc* 13:159–165.
- Roomans GM. 2001. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 10:1–19.
- Roomans GM. 2002. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* 18:1–8.
- Salido M, Vilches J, Roomans GM. 2004. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int* 28:397–402.
- Sanchez-Quevedo MC, Crespo PV, Garcia JM, Campos A. 1989. X-ray microanalytical histochemistry of human circumferential and mandible dentine. *Bone Miner* 6:323–329.
- Schrage NF, Benz K, Beaujean P, Burchard WG, Reim M. 1993. A simple empirical calibration of energy dispersive X-ray analysis EDXA on the cornea. *Scanning Microsc* 7:881–888.
- Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mitchinson MJ, Cary NR. 1999. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: An X-ray microanalytical study. *J Pathol* 188:100–106.
- Somlyo AV, Shuman H, Somlyo AP. 1989. Electron probe X-ray microanalysis of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and other ions in rapidly frozen cells. *Methods Enzymol* 172:203–229.
- Statham PJ, Pawley JB. 1978. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc* 1:469.
- Tegtmeyer S, Papanthiou I, Müller-Goymann CC. 2001. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 51:119–125.
- Vanthanouvong V, Hogman M, Roomans GM. 2003. In vitro and in situ experimental model for X-ray microanalysis of intestinal epithelium. *Microsc Res Tech* 62:211–217.
- Wang JJ, Carlson EC, Liu CY, Kao CW, Hu FR, Kao WW. 2002. Cis-regulatory elements of the mouse *Krt1.12* gene. *Mol Vis* 8:94–101.
- Warley A. 1990. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* 157:129–138.
- Warley A. 1994. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc* 8:129–137.
- Warley A. 1997. X-ray microanalysis for biologists. Cambridge, UK: Portland Press.
- Warley A, Fernandez-Segura E, López-Escámez JA, Campos A. 1994. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* 18:915–916.
- Zhu C, Joyce NC. 2004. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1743–1751.
- Zierold K. 1997. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:70–76.





## Volumetric and ionic regulation during the *in vitro* development of a corneal endothelial barrier

M. Alaminos<sup>a,b,\*</sup>, M. González-Andrades<sup>a</sup>, J.I. Muñoz-Ávila<sup>c</sup>, I. Garzón<sup>a</sup>,  
M.C. Sánchez-Quevedo<sup>a</sup>, A. Campos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Histology, University of Granada, E18012 Granada, Spain

<sup>b</sup> FIBAO Foundation and University Hospital San Cecilio, E18012 Granada, Spain

<sup>c</sup> Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, E18012 Granada, Spain

Received 30 October 2007; accepted in revised form 14 February 2008

Available online 26 February 2008

### Abstract

Corneal endothelium is responsible for generating an ion flux between the corneal stroma and the anterior chamber of the eye that is necessary for the cornea to remain transparent. However, the ion transport regulatory mechanisms that develop during the formation of the endothelial barrier are not known. In this study, we determined the influence of cell confluence on cell volume and intracellular ionic content on the corneal endothelial cells of rabbits. Our results demonstrate that non-confluent endothelial cells display a hypertrophic volume increase, with higher intracellular contents of potassium and chlorine than those of confluent cells. In contrast, when cells reach confluence and the endothelial barrier forms, cell volume decreases and the intracellular contents of potassium and chlorine decrease. Our genetic analysis showed a higher expression of CFTR and CA2 genes in non-confluent cells, and of the gene KCNC3 in confluent cells. These results suggest that the normal ionic current that keeps the corneal stroma dehydrated and transparent is regulated by cell–cell contacts and endothelial cell confluence, and could explain why the loss of corneal endothelial cells is often associated with corneal edema and even blindness.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** corneal endothelial cells; ionic transport; tissue engineering; microanalysis

### 1. Introduction

Corneal endothelium is a single-cell-thick layer of tissue that forms a boundary between the corneal stroma and the anterior chamber of the eye, and is responsible for maintaining corneal transparency (Joyce, 2003; Maurice, 1972; Mergler and Pleyer, 2007). The corneal endothelium fulfills the important physiological function of regulating sodium and potassium concentrations in the anterior pole of the eye. This regulation mechanism is able to control the level of hydration of the stroma and, thus, allows the cornea to remain transparent and transmit the incoming light to the retina

(Bonanno, 2003; Joyce, 2003). According to the “pump-leak hypothesis” (Bryant and McDonnell, 1998), the corneal stroma has a tendency to swell due to the presence of non-diffusible, negatively charged molecules such as glycosaminoglycans (Fischbarg and Maurice, 2004; Hedbys and Mishima, 1962; Hodson, 1997). However, the stromal hydration level is maintained by an active process of ion transport across the corneal endothelium from stroma to aqueous humor (Davies et al., 2004; Hodson and Miller, 1976; Huff and Green, 1981).

Our understanding of the function of the corneal endothelium has expanded greatly over the past years. However, the intrinsic events of ion transport that occur across the endothelial cells, and the role that several ions could play in this transport process, have not been fully explored (Green, 1991; Mergler and Pleyer, 2007). Investigation of the electrophysiology and ion channel expression of the corneal endothelium by highly sensitive measuring methods is

\* Corresponding author. Department of Histology, University of Granada, Avenida de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243515; fax: +34 958 244034.

E-mail address: [malaminos@histolii.ugr.es](mailto:malaminos@histolii.ugr.es) (M. Alaminos).

a new field that may open new perspectives. It not only will help to better understand physiological functions of the cornea, but also may have direct clinical implications (Mergler and Pleyer, 2007).

In this context, one of the most sensitive methods that have been used to quantify the intracellular concentration of several ions is electron-probe X-ray microanalysis. By using these techniques, several authors have previously analyzed the ionic transport that takes place in renal tubular cells and other types of epithelia (Rick et al., 1983,1986; Thurau et al., 1979a,b), whereas our research group have been able to determine the normal ionic concentrations in rabbit corneal endothelial cells (Alaminos et al., 2007).

Different types of ion channels have been described so far in corneal endothelium. Most of these channels belong to the family of voltage-gated ion channels or to the family of transient receptor potential channels. Voltage-gated ion channels are transmembrane protein pores that are permeable to ions and particularly sensitive to the change of transmembrane potential difference, and include in the cornea several sodium, potassium, chloride and calcium channels. Then, transient receptor potential channels include some store-operated calcium channels as well as a diverse group of cation channels that act as cellular sensors of diverse functions (Mergler and Pleyer, 2007).

Several studies have traditionally demonstrated that the corneal endothelium counteracts the tendency of the corneal stroma to swell by removing excess stromal fluid via the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Crawford et al., 1995; Lim and Fischbarg, 1981; Maurice, 1972; Tervo and Palkama, 1975) and bicarbonate-dependent  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Barfort and Maurice, 1974; Hodson and Miller, 1976) ionic pumps, which are located mainly on the basolateral plasma membranes (Joyce, 2003; Tervo and Palkama, 1975). However, several reports suggest that the maintenance of stromal hydration by the corneal endothelium mainly relies on active transendothelial bicarbonate and chloride transport, with bicarbonate as the principal ionic mechanism of corneal deturgescence (Bonanno, 2003; Davies et al., 2004; Fischbarg and Lim, 1974; Hodson, 1974; Hodson and Miller, 1976). The major chloride channels which are expressed in the rabbit corneal endothelium are the chloride channels CIC-2, CIC-3, CIC-5, CIC-6 and CIC-7, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Sun and Bonanno, 2002; Zaidi et al., 2004) and the calcium activated chloride channel-1 (CLCA1) (Itoh et al., 2000). Finally, there is evidence which suggests that transient receptor potential (TRP) channels, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  ionic channels could be expressed in several types of cells (Becker et al., 2005; Mergler and Pleyer, 2007). In addition, further studies elucidate the importance of exploring the function of definite ion channels, in particular, investigations of potassium and calcium channels in human corneal endothelial cells (Green et al., 1994; Mergler et al., 2003; Mergler and Pleyer, 2007; Rae and Watsky, 1996; Rae et al., 1989, 1990; Watsky et al., 1992). Exact regulation of all those ionic channels is crucial for a proper function of the corneal endothelium.

On the other hand it is well known that, in contrast to rabbit corneal endothelium (Hirsch et al., 1975; Mimura and Joyce, 2006; Staatz and Van Horn, 1980; Von Sallmann et al., 1961), the proliferative capacity of the human corneal endothelium is very limited. Evidence strongly suggests that cell division, if it occurs, plays only a minor role as a repair mechanism in mature corneal endothelium *in vivo* (Joyce, 2003). Therefore, when corneal endothelial cells are lost due to trauma or age, the remaining cells tend to migrate and hypertrophy, thereby restoring the endothelial confluent barrier but reducing the number of cells that comprise the corneal endothelium (Crawford et al., 1995; Fukami et al., 1988; Jongebloed et al., 1987; Matsubara and Tanishima, 1983; Stiemke et al., 1991). This form of repair has been designated as monolayer spreading (Joyce et al., 1990) or endothelial compensation, which is necessary for maintaining a confluent endothelial cell barrier in the cornea which in turn, is responsible for the transparency of the cornea. A number of factors can contribute to endothelial cell loss (Mergler and Pleyer, 2007), including aging, trauma, ocular surgery, Fuchs' endothelial dystrophy, and Type 1 diabetes. This accelerated cell loss may eventually result in compromised corneal function and decompensation which will require surgical intervention. Currently, the standard treatment for endothelial decompensation is full-thickness corneal transplantation (keratoplasty), although the experimental transplantation of corneal endothelial cells is currently being researched. Consequently, a better characterization and improved knowledge of endothelial ion channels may have an impact on clinical management (Joyce, 2003).

In this context, the influence of cell confluence as a functional regulator mechanism of endothelial ionic pumps and channels has yet to be fully elucidated. By one or another mechanism, the formation of stable cell–cell contacts on confluent corneal endothelial cells has demonstrated its capability to regulate endothelial replication and maintain the corneal endothelium in a non-replicative state (Joyce, 2003). Interestingly, different authors have demonstrated that corneal endothelial cells develop mature cell–cell junctions only when the cells have spread and made direct contacts with each other, whereas the mean number of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pumps per cell in confluent endothelial cultures seems to vary in direct proportion to the density of cells in the culture (Crawford et al., 1995). All of these data reveal that the formation of a confluent endothelial cell barrier is able to activate different genetic pathways which, in turn, are responsible for the endothelium exerting its physiological functions in the cornea. However, the relationship between cell confluence and the activation of the endothelial ionic pumps and channels has not been established to date.

In this work, we have carried out a microanalytical and genetic study to determine the role of cell confluence on the endothelial function. First, we have quantified the intracellular content of several elements in rabbit corneal endothelial cells at different levels of cell confluence. Subsequently, we have determined the gene expression and function of different ionic pumps that are activated when the cells form a confluent

endothelial barrier in culture. Although all this work has been carried out using rabbit corneal endothelial cells, which have important differences with the human, principally its high capacity for regeneration compared with the limited ability of the human corneal endothelium (Von Sallmann et al., 1961; Hirsch et al., 1975; Staatz and Van Horn, 1980; Mimura and Joyce, 2006), our results could contribute to a better understanding of the physiology of the human corneal endothelium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation and culture of rabbit corneal endothelial cells

Ten rabbit corneas were obtained from five adult New Zealand white rabbits weighing approximately 2 kg and euthanized by lethal intracardiac injection of 1 M CaCl<sub>2</sub> under general anesthesia with Fluorane. In order to isolate the endothelial cells, the inner side of each cornea was treated with trypsin 0.5 g/L–EDTA 0.2 g/L solution (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37 °C and the Descemet's layer of the corneas was mechanically dissected with a surgical microscope. Isolated cells were cultured in 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma–Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma–Aldrich), 4 mM L-glutamine, 1% antibiotic solution (Gibco BRL) and different growth factors: insulin (5 mg/ml), triiodothyronine (1.3 ng/ml), cholera toxin (8 ng/ml) and hydrocortisone (0.4 mg/ml) according to previously published protocols (Alaminos et al., 2006, 2007). The medium was changed once every 3 days.

This research was approved by the institutional experimentation committee, and all animals were treated according to the guidelines on animal welfare established in the *Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research* by The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (<http://www.arvo.org/eweb/dynamicpage.aspx?site=arvo2&webcode=AnimalsResearch>).

### 2.2. Ionic quantification by electron probe X-ray microanalysis

Quantification of the intracellular concentrations of Na, K, Cl, S, P, Ca and Mg in the corneal endothelial cells was carried out by electron probe X-ray microanalysis associated with scanning electron microscopy following previously published methods (Alaminos et al., 2006, 2007). Briefly, corneal endothelial cells were subcultured using trypsin–EDTA on gold grids covered with a thin layer of Pioloform (polyvinyl butyryl) (Ted Pella Inc., CA, USA) and sterilized overnight under UV light. After 24 h of culture, support grids containing the endothelial cells were washed in ice-cold distilled water for 5 s to remove the extracellular medium and the grids were immediately plunge-frozen in liquid nitrogen (Abraham et al., 1985; Warley, 1994). After cryofixation, the grids

were freeze-dried at increasing temperatures for 24 h in an E5300 Polaron freezer-drier apparatus equipped with a vacuum rotary pump system. Freeze-dried gold grids were carbon-coated in a high-vacuum coating system and microanalyzed within 6 h using a Philips XL30 scanning electron microscope (SEM) equipped with an EDAX DX-4 microanalytical system and a solid-state backscattered electron detector. The samples were examined with SEM with a combination of secondary electron and backscattered electron imaging modes. All determinations were performed on the central area of the cell nucleus. To determine total ion content, we used the peak-to-local-background (P/B) ratio method (Boekestein et al., 1984; Fernández-Segura et al., 1997; Staham and Pawley, 1978) with reference to standards composed of 20% dextran containing known amounts of inorganic salts (Warley, 1990). For that reason, all ionic concentrations were expressed in mmol/kg dry cell weight.

For the analysis of confluent cells, we seeded 2500 corneal endothelial cells per mm<sup>2</sup> on gold grids, whilst 1500 cells were seeded to obtain subconfluent cells (intermediate degree of confluence) and 500 cells per mm<sup>2</sup> in the case of the non-confluent cells. In all cases, the degree of confluence was visually confirmed before processing the samples.

To quantify the amount of intracellular water that exist in the cells used in this work, we first obtained a cell pellet of confluent and non-confluent rabbit corneal endothelial cell cultures, and determined their weight using a precision balance. Then, we lyophilized the cell pellets by freeze-drying and determined the weight of the dried cell pellets. The absolute and relative differences of wet vs. dry weight were determined for confluent and non-confluent cells using the following formula reported by Warley (1997):  $f_d + f_{aq} = 1$ ; where  $f_d$  is the mass fraction after drying the sample and  $f_{aq}$  is the mass fraction of water in the cells. To determine the concentration of each ion per mg of total cell protein, we determined the percentage of proteins that exist in freeze-dried confluent and non-confluent corneal endothelial cell pellets using a protein quantification kit (Sigma–Aldrich).

### 2.3. Cell volume measurement using scanning electron microscopy

To assess the cell volume of confluent and non-confluent corneal endothelial cells, we used a FEI Quanta 200 environmental scanning electron microscope. Firstly, confluent and non-confluent cells were cultured and prepared on Pioloform-covered gold grids as reported above for microanalysis. Then, three-dimensional measures (average cell length, width and height) were taken in 50 confluent cells and 50 non-confluent cells using a secondary electron imaging mode. Cell volume was estimated for each cell using a modification of the equation reported by Korchev et al. (2000):

$$V_{\text{Cell}} = z(x, y) \times dx \times dy$$

where  $z(x, y)$  is the average height of each specific cell; and  $dx$  and  $dy$  are scan increments (pixel size) in  $x$  and  $y$  directions.

#### 2.4. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity assay

To determine the role of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the differential intracellular ionic concentrations found for confluent and non-confluent cells, we quantified the ionic cell content in cells in which the function of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase had been inhibited by ouabain. Subsequently, confluent and non-confluent endothelial cells were cultured on gold grids covered with pelloform as described above and treated with 1 mM ouabain for 15 min. After this period of time had elapsed, the function of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump was evaluated by incubation of the cells for 15 min in 5 mM RbCl. As an analog of K, Rb uptake is a good indicator of the activity of this pump.

The grids containing the endothelial cells were then cryoprocessed and microanalyzed as indicated above. For Rb content, semiquantitative data for Rb  $L\alpha$  peaks were obtained with the P/B ratio method.

#### 2.5. Determination of gene expression by RT-PCR

Total RNA from cultured cells was extracted and purified using the QIAgen RNeasy Mini Kit (QIAgen ref. #74106). The quality of the RNA was assessed by optical inspection in agarose gels under denaturing conditions. Two micrograms of RNA were reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) and amplified using specific primers for the genes *ATPIA1*, *ATPIB1*, *CA2*, *CFTR*, *CLC2*, *CLC3*, *KCNC3*, *KCNJ2*, *KCNQ1*, *NBC1* and *SLC1A2*. In the case of genes whose mRNA sequence has not been previously determined in rabbits, specific RT-PCR oligonucleotides were designed in

the regions of mRNA sequence consensus among several mammal species with an available sequence. In these cases, mRNA sequences of rats, mice and human beings and, when available, monkeys and cows, were compared using Multalin software (Corpet, 1988), and the regions of maximum consensus were identified. Specific oligonucleotide sequences and annealing temperatures for the genes used in this study are shown in Table 1.

PCR was carried out for 35 cycles (95 °C for 30 s, annealing temperature for 30 s and 72 °C for 30 s) in a volume of 25  $\mu\text{l}$  with a final concentration of 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 mmol/L deoxynucleotide triphosphate, 0.25 mmol/L of each primer and 2 units of Taq polymerase (Life Technologies) in 1 $\times$  reaction buffer. Specific primers for the  $\beta$ -actin gene were used under the same conditions to ensure cDNA quality and loading accuracy. PCR-amplified products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and semi-quantified by using the program Quantity One (Bio-Rad).

#### 2.6. Protein expression by Western blot and immunocytochemistry

For SDS-PAGE gels, a total of 15  $\mu\text{g}$  of each total cell protein extract was loaded on polyacrylamide gels (Bio-Rad), separated by electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes according to standard procedures. Incubation with anti-KCNC3 (ABnova ref. ABVAP9C4S, dilution 1:30), anti-CFTR (Abcam ref. ab2916, dilution 1:100), anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Abcam ref. ab2873, dilution 1:100), anti-CA2 (Abcam ref. ab8953, dilution 1:150) and anti- $\beta$ -tubulin antibodies

Table 1  
Specific oligonucleotides used in this work for the amplification of mRNA fragments by RT-PCR

Name	Sequence	Annealing temperature (°C)	Reference
ATPIA1-forward	5'-TGCTACAGAAGAGGAACCTC-3'	55	This work
ATPIA1-reverse	5'-TCCGGTTCAGTCAGAGTTC-3'	55	This work
ATPIB1-forward	5'-GCCTGGCTGGCATTCTTCAT-3'	61	This work
ATPIB1-reverse	5'-CTGCAGGAGTTTGCCATAGTA-3'	61	This work
CA2-forward	5'-GACCTGAGCACTGGCATAAG-3'	61	This work
CA2-reverse	5'-GTGATGGGTTCCTTGAGCACA-3'	61	This work
CFTR-forward	5'-GAGGGATTGGGGAATTATTGAG-3'	62	Al-Nakkash and Reinach, 2001
CFTR-reverse	5'-CTTGCTCGTTGACCTCCACTC-3'	62	Al-Nakkash and Reinach, 2001
CLC2-forward	5'-GGGCTGGTGGAGGAGCT-3'	65	Davies et al., 2004
CLC2-reverse	5'-GAATCCCCTCGGGGAACC-3'	65	Davies et al., 2004
CLC3-forward	5'-GTAGTAACACTAACAGGATTGGC-3'	56	Davies et al., 2004
CLC3-reverse	5'-ACTAATGTGATGGTTTTAATCATT-3'	56	Davies et al., 2004
KCNC3-forward	5'-GTGCTCAACTACTACCGCA-3'	55	This work
KCNC3-reverse	5'-GATGAGGATGAAGAAGAGCG-3'	55	This work
KCNJ2-forward	5'-AACAGTGCAGGAGCCGCTTT-3'	55	This work
KCNJ2-reverse	5'-AGTCTCTGGCACTACAAAGGG-3'	55	This work
KCNQ1-forward	5'-TTCCATCGTCCTGGTCTG-3'	63	This work
KCNQ1-reverse	5'-ATCTGCCGGTTGAAGTGCTTC-3'	63	This work
NBC-forward	5'-GTGCCAAGTGAGTCAAGCCA-3'	57	This work
NBC-reverse	5'-GACATCATCIAGGAAGCTGAG-3'	57	This work
SLC12A2-forward	5'-GTGGACCTGGTTTCCGAGAA-3'	55	This work
SLC12A2-reverse	5'-GAGCAACTCCACCACAGTTTC-3'	55	This work
Beta-actin-forward	5'-CGTGGCCGCCCTAGGCACCA-3'	65	Hunter et al., 2006
Beta-actin-reverse	5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'	65	Hunter et al., 2006

(Sigma–Aldrich, ref. A5441, dilution 1:250) was carried out for 2 h, followed by hybridization to secondary antibody for 1 h.

For KCNC3, we concentrated this protein by immunoprecipitation before carrying out the Western blot assay. For this purpose, we used anti-KCNC3 primary antibodies attached to protein G Sepharose (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks, UK) and incubated them with 200 µg of each total cell protein extract for 2 h.

Immunocytochemical analysis of both confluent and non-confluent corneal endothelial cells was carried out by growing the cells directly on culture chamber slides (ref. 154852, Nalge Nunc, Naperville, IL, USA). Immunocytochemistry was carried out with standard streptavidin-biotin peroxidase methodology using microwave antigen retrieval and anti-CFTR antibody (Abcam ref. ab2916, dilution 1:100).

### 2.7. Statistical analysis

To evaluate the statistical significance of the differences between volume and mean intracellular ionic concentrations for confluent and non-confluent cells, we used the non-parametric Mann–Whitney test. In order to compare RT–PCR gene expression between confluent and non-confluent cells, we used Fisher's exact test. For individual tests, a two-sided  $p$  value lower than 0.05 was considered statistically significant. For multiple comparisons, a Bonferroni-adjusted significance level of 0.001 was considered significant as up to 45 statistical tests were used at the same time.

## 3. Results

### 3.1. Morphological and chemical analysis of isolated corneal endothelial cells

Isolated corneal endothelial cells proliferated rapidly in culture, reaching subconfluence around Day 9 of culture ( $8.9 \pm 3.3$  days) in specific media. In order to obtain confluent endothelial cell cultures with a density similar to that of native rabbit cornea, we seeded a high density of cells on gold grids ( $2500$  cells/mm<sup>2</sup>), whereas a lower cell density was used to obtain non-confluent cultures ( $500$  cells/mm<sup>2</sup>). As shown in Fig. 1, confluent cells displayed a regular shape and a relatively small size (average volume  $6586.5 \pm 4681.0$  µm<sup>3</sup>), whereas non-confluent endothelial cells became less regularly shaped when compared to cells at higher densities and displayed a significant volume increase (average volume  $78772.1 \pm 62858.8$  µm<sup>3</sup>). Differences were statistically significant ( $p < 0.001$  for the Mann–Whitney  $U$ -test).

When the amount of proteins was analyzed in corneal endothelial cells, we found that 51.43% of the dry weight of the cells used in our study was proteins, with no differences between confluent and non-confluent cells. In addition, the water content was similar for confluent cells (69.1%) and for non-confluent cells (69.5%), with a cell water space of  $4.34$  µl H<sub>2</sub>O/mg protein for confluent cells and  $4.43$  µl H<sub>2</sub>O/mg protein for non-confluent cells (average  $4.39$  µl H<sub>2</sub>O/mg protein).

### 3.2. Ionic content of confluent and non-confluent corneal endothelial cells

As shown in Table 2, our analysis of 150 confluent cells and 150 non-confluent cells revealed that the intracellular concentration of different ions was significantly associated to the level of cell confluence. Subsequently, the intracellular concentrations of several ions as determined by electron probe X-ray microanalysis (Fig. 2) were significantly higher in non-confluent cells than in confluent endothelial cells, including K, with a ratio of 0.67 for confluent vs. non-confluent cells ( $p < 0.001$  for the Mann–Whitney  $U$ -test), Cl ( $p < 0.001$ ), Mg ( $p < 0.001$ ) and P ( $p < 0.001$ ), whereas a marginally-significant trend towards a higher concentration of Na in confluent cells was detected ( $p = 0.04$ ). No differences were found for the intracellular contents of Ca and S ( $p > 0.05$ ). It is noteworthy that when we analyzed 65 endothelial cells with an intermediate level of confluence (subconfluent cells), we found that the intracellular concentrations of both K and Na ranged between the concentrations found in confluent and in subconfluent cells. When all concentrations were expressed as nmol per mg of protein, we found that the average intracellular concentrations of Na, Mg, P, S, Cl, K and Ca were 87.12, 35.04, 576.97, 90.90, 154.31, 558.73 and 27.10 nmol per mg of protein, respectively.

Furthermore, the Kendall tau correlation test confirmed that the association between the level of confluence and the intracellular ionic content was either significant ( $p < 0.001$  for Mg, P, Cl and K) or marginally significant ( $p = 0.02$  for Na).

### 3.3. The role of the ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in confluent and non-confluent cells

In order to determine the eventual role of the ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase membrane pump in the differential ionic content found between confluent and non-confluent cells, we quantified the intracellular concentrations of several ions in 20 confluent cells and 20 non-confluent cells treated with ouabain, a *bona fide* inhibitor of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump, in the presence of Rb. Total Rb uptake along with the Rb fraction which was ouabain-insensitive were measured in both confluent and non-confluent cells by X-ray microanalysis. As expected (Table 2), the intracellular contents of Na and Cl increased markedly whilst the cellular K content decreased significantly after the treatment with 1 mM ouabain in both confluent and non-confluent cells. As shown in Table 2, incubation of our cells with ouabain and Rb for 15 min was associated to 47.50% and 46.89% Rb uptake inhibition for confluent and non-confluent endothelial cells, respectively. Similarly, we found a K uptake decrease of 69.41% for confluent endothelial cells and 66.88% for non-confluent cells, which is near the 79% inhibition reported by Riley et al. (1998) using longer incubation times.

Furthermore, our results demonstrated that the ouabain-mediated inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump did not change the significant differences of intracellular ionic concentrations that we found between confluent and non-confluent

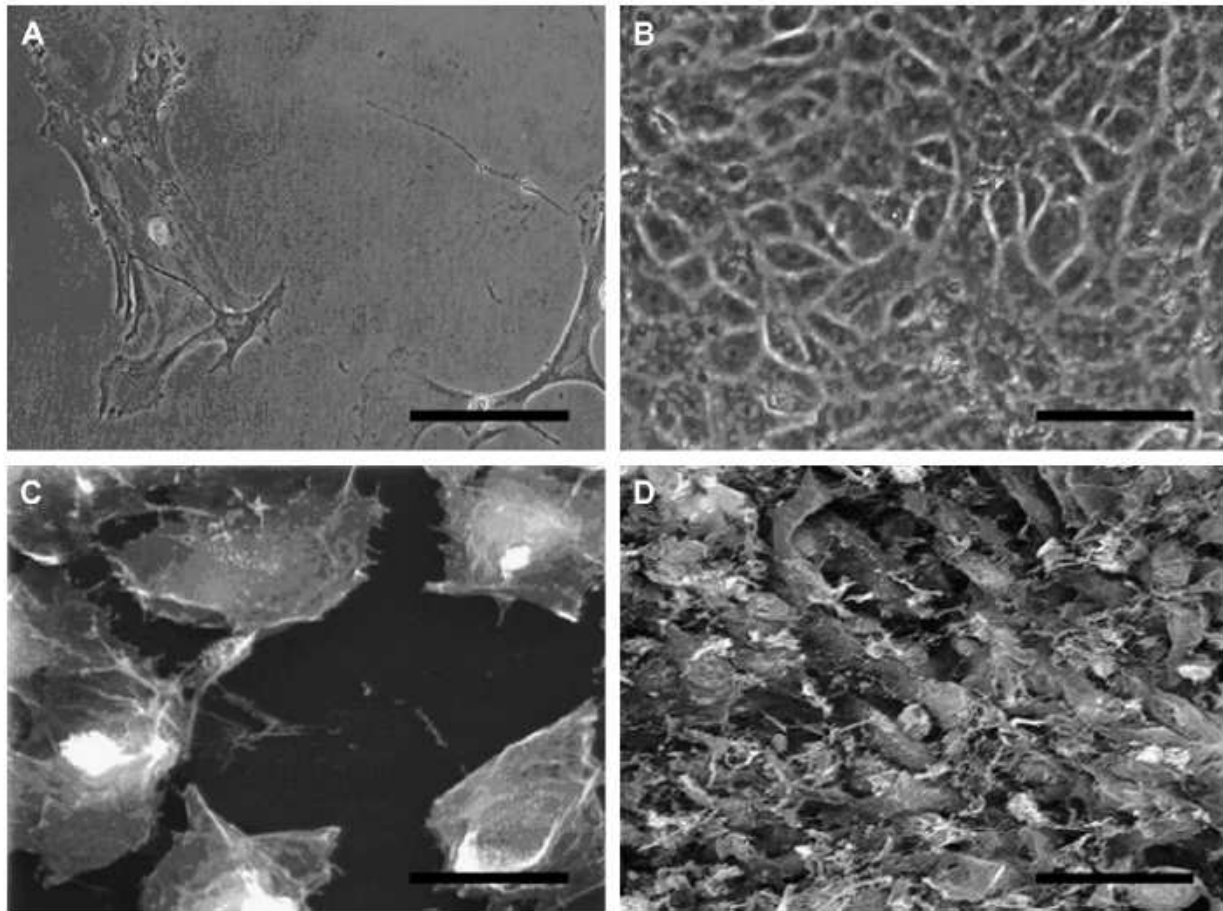


Fig. 1. Microscopic images of confluent and non-confluent rabbit corneal endothelial cells kept in culture. Non-confluent cells displayed elongated shapes and large cell sizes (panel A, light microscopy image and panel C, scanning electron microscopy image), whereas confluent endothelial cells were more regularly shaped, with a polyedric outline and a significant cell size reduction (panel B, light microscopy image and panel D, scanning electron microscopy image). Scale bars: 50  $\mu$ m.

cells, with a confluent vs. non-confluent cells K ratio of 0.62, which was very similar to the K ratio of 0.63 found in Rb-treated control cells.

These results suggest that the ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump is not responsible for the different intracellular ionic concentrations that we found between confluent and non-confluent cells.

#### 3.4. RNA expression of genes encoding for different ionic pumps by RT-PCR

Although several ionic pumps have been described in the corneal endothelium, the identity and location of all the components of this transport system are not known. For that reason, we have carried out semiquantitative RT-PCR expression assays in order to determine the mRNA expression of different genes related to membrane ionic transport in confluent and non-confluent corneal endothelial cell cultures.

As shown in Fig. 3, our results show that confluent cells expressed higher amounts of mRNA corresponding to the gene *KCNC3* ( $p < 0.001$  for Fisher's exact test), which encodes for the potassium channel, voltage-gated, Shaw-related

subfamily member 3 (Haas et al., 1993). In contrast, non-confluent corneal endothelial cells showed a higher expression of the genes *CFTR*, encoding for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Sun et al., 2003) and *CA2*, encoding for carbonic anhydrase (Bonanno, 2003; Hageman et al., 1991) ( $p < 0.001$  for Fisher's exact test for both genes). A non-significant trend towards a higher expression of the genes *ATP1A1* ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump) and *NBC1* (a  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter) (Romero et al., 1998) was detected in confluent cells, and of the gene *CLC2* (voltage-gated chloride channel) (Cid et al., 1995) in non-confluent cells. No differences were found for the genes *ATP1B1*, *CLC3*, *KCNJ2*, *KCNQ1*, and *SLC1A2*.

#### 3.5. Protein expression of genes differentially expressed in confluent and non-confluent corneal endothelial cells

As shown in Fig. 3, our Western blot analysis of whole cell lysates corresponding to confluent and non-confluent cells revealed that *KCNC3* protein expression was higher in confluent cells than in non-confluent cells, whereas the expression of the chloride channel *CFTR* was higher in non-confluent cells than

Table 2  
Ionic content of corneal endothelial cells at different levels of confluence as determined by electron probe X-ray microanalysis

	[Na] <sup>a</sup>	[Mg] <sup>a</sup>	[P] <sup>a</sup>	[S] <sup>a</sup>	[Cl] <sup>a</sup>	[K] <sup>a</sup>	[Ca] <sup>a</sup>	Rb <sup>b</sup>
Non-confluent cells	43.09 ± 0.14	18.82 ± 0.04	306.81 ± 0.28	50.93 ± 0.11	95.40 ± 0.24	357.14 ± 0.58	13.36 ± 0.06	—
Intermediate confluence cells	45.58 ± 0.26	19.66 ± 0.07	328.67 ± 0.57	40.08 ± 0.17	62.72 ± 0.53	266.06 ± 0.73	15.11 ± 0.11	—
Confluent cells	45.74 ± 0.12	15.58 ± 0.03	254.72 ± 0.30	49.24 ± 0.08	79.97 ± 0.21	238.87 ± 0.55	13.35 ± 0.05	—
Ratio confluent vs. Non-confluent <sup>c</sup>	1.06	0.83 <sup>d</sup>	0.83 <sup>d</sup>	0.97	0.84 <sup>d</sup>	0.67 <sup>d</sup>	1.00	—
Non-confluent cells treated with rubidium	54.76 ± 1.36	16.29 ± 0.17	267.44 ± 1.23	47.86 ± 0.41	105.09 ± 1.98	202.70 ± 2.19	10.33 ± 0.37	1.77 ± 0.02
Confluent cells treated with rubidium	55.48 ± 0.70	14.15 ± 0.28	282.28 ± 1.27	50.26 ± 0.52	98.90 ± 1.29	126.90 ± 2.47	17.30 ± 0.36	1.60 ± 0.03
Ratio confluent vs. Non-confluent treated with rubidium <sup>c</sup>	1.01	0.87	1.06	1.05	0.94	0.63 <sup>d</sup>	1.67 <sup>d</sup>	0.90
Non-confluent cells treated with ouabain	132.16 ± 1.20	14.22 ± 0.26	285.43 ± 1.83	53.55 ± 0.49	106.36 ± 1.61	118.28 ± 1.60	10.60 ± 0.43	0.94 ± 0.01
Confluent cells treated with ouabain	123.21 ± 1.40	14.12 ± 0.22	281.69 ± 1.50	43.37 ± 0.43	110.35 ± 2.47	73.06 ± 1.01	10.87 ± 0.22	0.84 ± 0.01
Ratio confluent vs. Non-confluent treated with ouabain <sup>c</sup>	0.93	0.99	0.99	0.81 <sup>d</sup>	1.04	0.62 <sup>d</sup>	1.03	0.89

<sup>a</sup> As mean ± standard error (in mmol/kg dry weight).

<sup>b</sup> As mean ± standard error (semiquantitative).

<sup>c</sup> Ratio of ionic concentration in confluent vs. non-confluent cells.

<sup>d</sup> Differences are statistically significant for the comparison of confluent vs. non-confluent cells ( $p < 0.001$ ).

in confluent cells. However, no differences were found for the expression of both CA2 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump between confluent and non-confluent endothelial cells at the protein level.

Similarly, immunocytochemical detection of CFTR showed that non-confluent corneal endothelial cells expressed higher amounts of this protein in comparison with confluent endothelial cells (Fig. 3).

#### 4. Discussion

Both the number of endothelial cells and the structural integrity of the corneal endothelial cell barrier are known to play an important role in the normal cornea. On one hand, the stromal imbibition pressure that is primarily generated by the hydrophilic stromal glycosaminoglycans drives the fluid leak into the cornea, leading to a loss of transparency and impaired vision (Bonanno, 2003; Hedbys and Mishima, 1962). On the other hand, the ionic current driven by the corneal endothelium barrier is able to maintain the level of corneal dehydration and thus, the transparency of the visual pathway. The average adult has about 2000–3000 endothelial cells/mm<sup>2</sup> of cornea, but this number may vary in response to several clinical conditions. In fact, there are a number of clinical cases and factors which can contribute to endothelial cell loss including, among others, aging, Fuchs' endothelial dystrophy, trauma/surgery, chronic anterior uveitis, and Type 1 diabetes (Bonanno, 2003). In all these conditions, the loss of integrity of the endothelial barrier due to endothelial cells loss is followed by a hypertrophy of the remaining cells, trying to cover all the posterior surface of the cornea and reestablish the normal corneal endothelial barrier. Although this endothelial compensation is important for corneal function, very little is known about the cellular and molecular mechanisms that occur during this process. On the other hand, some reports demonstrated that the human endothelium is by some means tolerant of disruptions to its integrity, including localized

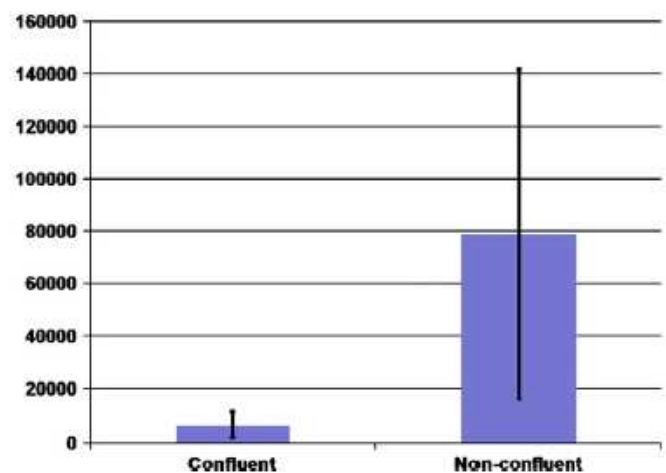


Fig. 2. Histogram representing average cell volume of confluent and non-confluent corneal endothelial cells (as μm<sup>3</sup> per cell). Dark lines represent standard deviations for each case.



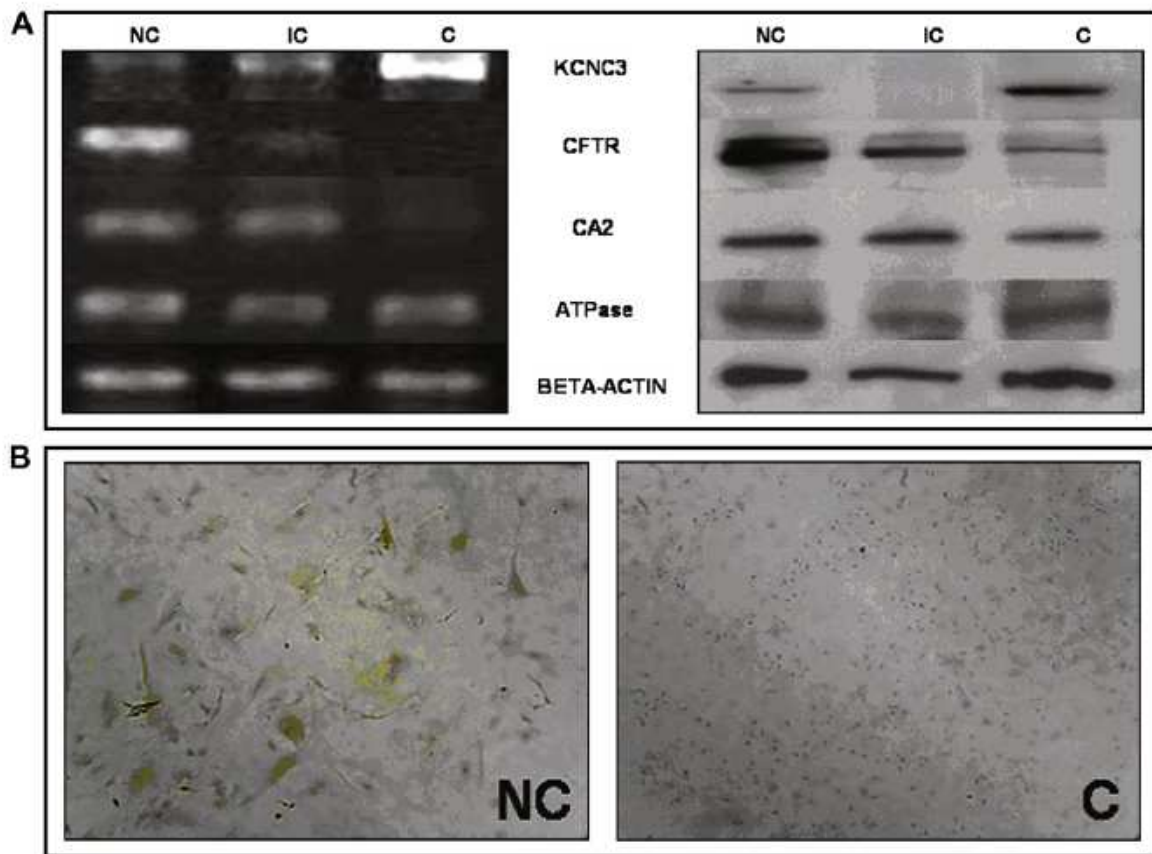


Fig. 3. Expression of several genes encoding for ionic pumps in non-confluent and confluent corneal endothelial cells. (A) mRNA (left panel) and protein (right panel) expression for KCNC3, CFTR, CA2 and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase genes in cells of different confluence level. Expression of the housekeeping gene beta-actin was used as a control of RNA loading in RT-PCR assays and of protein loading for Western blot. (B) Immunocytochemical analysis showing that the expression of CFTR protein is higher in non-confluent than in confluent cells. NC, non-confluent cells; IC, intermediate confluence cells; C, confluent corneal endothelial cells.

wounding (Fukami et al., 1988) and localized losses due to aging (Jongebloed et al., 1987). For that reason, small areas of Descemet's membrane can be exposed without apparent degradation of transendothelial fluid transport in some animal models (Bourne et al., 1994; Huang et al., 1989; Van Horn et al., 1977). Similarly, Laing et al. (1981) found in Fuchs' endothelial dystrophy that all stages of *cornea guttata* can occur in a cornea clinically free of edema, while the endothelial pump rate is unaffected (Burns et al., 1981).

In this work, we have been able to determine the intracellular concentrations of several relevant ions in corneal endothelial cells by using electron probe X-ray microanalysis. In general, the average ionic concentrations that we found here are comparable to previous reports that determined the ionic composition of rabbit corneal endothelial cells (Alaminos et al., 2007), bovine corneal endothelium (Diecke et al., 1998) or rabbit ciliary epithelium (Bowler et al., 1996). All this supports the accuracy of the technique used in our work and suggests that the physiological status of the cells used here was not altered. However, since all analyses were carried out on freeze-dried cells, a potential dehydration error in the absolute estimates of intracellular ionic concentrations and cell volume cannot be excluded, and great caution must be used when these absolute values are analyzed.

By using electron probe X-ray microanalysis of rabbit corneal endothelial cells at different confluence levels, we thereby showed that confluent cells forming a continuous barrier were characterized by a lower concentration of K, with a relatively high concentration of Na, whereas non-confluent cells showed a significantly higher intracellular concentration of K. Interestingly, the intracellular contents of water were similar for confluent and non-confluent cells. This finding hints that the differential ionic contents that we found in both cell types (expressed as mmol/kg dry cell weight) are related to different ionic concentrations *in vivo*, and cannot be explained by a possible phenomenon of cell swelling or hyperhydration of confluent or non-confluent cells. These results, which had not been previously reported, imply that although human endothelium can compensate *in vivo* some disruptions of its integrity, the maintenance of a close endothelial monolayer by a high endothelial cell confluence could be crucial for the endothelium to exert its function properly. Furthermore, and although the use of Pioloform as cell substrate could have affected the behavior of the cultured cells, our results show that the cell volume of confluent cells is significantly lower than that of non-confluent cells, with a significant correlation between the cell volume and the intracellular ionic content. However, one of the limitations of our study is that the rabbit corneal endothelium has important

differences with the human endothelium, the main one being the former's high capacity for regeneration compared with the limited ability of the human corneal endothelium (Hirsch et al., 1975; Mimura and Joyce, 2006; Staatz and Van Horn, 1980; Von Sallmann et al., 1961).

Zhang and Roomans (1998) demonstrated that both K and Na concentrations vary in response to changes of the cell volume. Using HT29 cells, these authors showed that osmotic cell shrinkage is followed by stimulation of a regulatory volume increase (RVI) mechanism, where water is taken up concomitantly with Na and Cl. In contrast, when the cell volume increases by cell swelling or hypertrophy, a mechanism of regulatory volume decrease (RVD) is activated by the cell, in which water is extruded with a concomitant decrease in the intracellular concentrations of Cl and K followed by an increase in Ca (Becker et al., 2005). Therefore, RVD and RVI could be the basic regulatory mechanisms by which swollen and shrunken cells return to a normal volume or reach a temporary balance in ion distribution. Except for the case of Ca, which did not vary, all these data are in line with our results obtained using corneal endothelial cells, and could explain some of our findings. Thus, non-confluent corneal endothelial cells would show a trend towards hypertrophy and volume increase by monolayer spreading (Joyce et al., 1990) and endothelial compensation (Bonanno, 2003). So it is likely that the cells activate the RVD mechanism by using different cell membrane ionic pumps which would try to compensate for increase in volume. This mechanism would eventually lead to a water and ion extrusion to the extracellular space. Subsequently, when the cells have reached confluence and the endothelial monolayer has been re-established, endothelial compensation ceases and confluent cells would display relative cell volume shrinkage. In this case, and due to the RVD mechanism, a decrease in the intracellular concentrations of Cl and K would be found in the cells, as is the case with the endothelial cells used in this study. Therefore, all these processes could explain why confluent cells show lower concentrations of Cl and K than non-confluent cells. Conversely, it is also possible that some of our results be explained by the fact that cells kept in culture under different levels of cell confluence could be submitted to different levels of oxygen pressure. Thus, non-confluent endothelial cells, which had a significantly higher cell volume than confluent cells, could have been operating under a relative cell hypoxia compared with the confluent cultures with a higher cell density and smaller cell volume. Pericellular hypoxia is a well-known phenomenon of *in vitro* cell behavior and growth is a complex function of seeding density and dissolved oxygen gradient (Taylor et al., 1978, 1982).

Although volume change and the compensating mechanisms triggered by volume change could explain the different intracellular concentrations that we found between confluent and non-confluent corneal endothelial cells, the question related to the specific ionic pumps and membrane transporters involved in these changes remains unanswered. Elegant experiments carried out by Crawford et al. (1995) demonstrated that the number of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump sites per

cell progressively increases when confluent endothelial cells are seeded at low cell densities, and that these cells show a subsequent volume hypertrophy. Nevertheless, in our study, treatment of the endothelial cells with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor ouabain caused a significant inhibition of K uptake (66.88–69.41%) but it did not significantly alter the differential concentrations of Na and K that we found between confluent and non-confluent cells. For that reason, and since our western blot analysis did not show any protein expression differences for this ionic pump between confluent and non-confluent cells, we concluded that the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump is not responsible for the differential intracellular contents that we found in this work. Although the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump has long been considered to be the main membrane transporter involved in the ionic equilibrium at both the cellular and the extracellular level in corneal endothelial cells (Crawford et al., 1995; Lim and Fischberg, 1981; Maurice, 1972; Tervo and Palkama, 1975), our results suggest that the number of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pumps that are present in corneal endothelial cells does not vary depending on the confluence level of the cells nor the integrity of the corneal endothelial barrier. This statement is not in disagreement with the results published by Crawford et al. (1995), since these authors analyzed only confluent cultures of corneal endothelial cells. In contrast, our results are in agreement with reports by Bourne et al. (1994), who found that the spatial density of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump sites in wounded cat corneal endothelium did not correlate with endothelial permeability or fluid pump rate. Additionally, although in our study we found a non-significant higher expression of the mRNA corresponding to the gene *ATPA1* in confluent cell cultures ( $p > 0.05$ ), the protein expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase was similar for confluent and non-confluent cells. These findings suggest that cell regulation of the expression and function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase membrane pump could be complex and multifarious, especially due to the fact that all experiments have been carried out *in vitro* in this work, and it is well known that *in vitro* conditions could alter the physiological behavior of the cells. In this regard, Whikehart et al. (1987) demonstrated that the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase could show lowered activity and changed affinity when the corneal endothelium is cultured.

Theoretically, chloride cell channels should not be affected by ouabain treatment. However, our results show that ouabain incubation is associated to a chlorine increase that ranges between 12.5% for non-confluent cells and 37.9% for confluent cells (average 24.7%). Strikingly, some other researchers have previously found a concomitant increase in chlorine content after ouabain treatment in different types of cells, including MCF-7 breast cancer cells (Fernández-Segura et al., 1997), renal A6 cells (Borgmann et al., 1994) and vascular smooth cells (Krep et al., 1996). According to Borgmann et al. (1994), this increase in chlorine content may have resulted from cell swelling caused by the influx of NaCl and water in cells with ouabain-mediated K/Na ATPase inhibition (Borgmann et al., 1994).

In contrast, we demonstrated that the mRNA expression of the gene encoding for the ionic pump KCNC3 was

significantly higher in confluent cells forming a uniform barrier than in non-confluent endothelium ( $p < 0.01$ ), and that this finding correlated well with the protein expression determined by Western blot. *KCNC3* is an oxygen-sensitive (Patel and Honoré, 2001; Wang et al., 1996) voltage-dependent, Shaw-type potassium channel that can assume open or closed conformations in response to the voltage difference across the membrane (Chen and Davis, 2006). Thus, potassium ions may pass through this transporter in accordance with their electrochemical gradient. The expression of several genes of the family of KCN transporters has been previously reported in corneal endothelial cells, including *KCNJ2* (Rae and Shepard, 2000a; Yang et al., 2000) and *KCNC3* (Rae and Shepard, 2000b), whereas *KCNC4* (Lu, 2006; Wang et al., 2004) and *KCNJ2* (Rae and Shepard, 2000a) have been identified in corneal epithelial cells. In our case, the overexpression of *KCNC3* in confluent cells could be responsible for the lower intracellular concentration of K which we found in these cells. According to these results we hypothesize that, in a tight corneal endothelial barrier, confluence could lead endothelial cells to activate the expression and function of *KCNC3* as a way to control and regulate the intracellular contents of K. By doing this, the cells would activate the physiological transendothelial ionic current which exists in the normal endothelium which, in turn, would play a key role in maintaining the transparency of the cornea. In contrast, Patel and Honoré (2001) found that *KCNC3* channels can be blocked by hypoxia. For that reason, cellular hypoxia could also explain the low mRNA expression of the *KCNC3* gene in non-confluent endothelium rather than confluence *per se*.

On the other hand, it has been demonstrated that mRNA for the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) is present in the corneal endothelium (Sun et al., 2001), especially in the apical membrane of the cells (Sun and Bonanno, 2002), although its expression *in vitro* seems to be time-dependent (Brochiero et al., 2004). *CFTR* has significant permeability to  $\text{HCO}_3^-$  as well as to  $\text{Cl}^-$ , and it has been suggested that this membrane pump plays an important role in the transendothelial transport of both  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  (Sun and Bonanno, 2002). For this reason, the function of *CFTR* is partly dependent on the activity of carbonic anhydrase, an enzyme involved in the synthesis of  $\text{HCO}_3^-$  from  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  which is encoded by the gene *CA2* (Sun et al., 2003). In this regard, our results are in line with these presented in previous reports, since we found both *CFTR* and *CA2* expression in rabbit corneal endothelial cells. Nonetheless, in this case we demonstrated that the expression of these two genes correlated well with the level of confluence of the cultured cells. Whereas non-confluent cells showed higher expression of both *CFTR* and *CA2* mRNA, and of *CFTR* protein, the *in vitro* development of a confluent endothelial barrier was associated with a lower expression of these two genes. Since the final goal of *CFTR* and *CA2* is regulation of the intracellular content of  $\text{Cl}^-$ , it is possible that the overexpression of these genes in non-confluent cells could be in direct relation to the high

intracellular concentration of  $\text{Cl}^-$  which exists in non-confluent hypertrophic cells. Therefore, this would be a compensatory mechanism activated by volumetric change in non-confluent endothelial cells which, once again, would cease when the cells reach confluence and a continuous cell monolayer is formed. These findings are in agreement with reports by Xia et al. (1997), who found that several chloride channels have different expression patterns depending on the confluence level of the cell culture. Thus, disruption of monolayer integrity of human airway epithelia cultures would enable the activation of a cystic fibrosis “bypass” channel (ORDIC channel) that would remain refractory to activation in confluent human airway epithelia. Conversely, it is also possible that the different RNA and protein expression that we found for *CFTR* be explained by the different levels of hypoxia that could exist between confluent and non-confluent cells. According to Zaidi et al. (2004), hypoxia is known to upregulate *CFTR* expression in rabbit and human corneal cells. For that reason, and according to Fick’s law of gas diffusion (Metzen et al., 1995), larger cell volumes of non-confluent cells could be associated to lower levels of intracellular oxygen and, thus, to higher levels of hypoxia and *CFTR* upregulation. In contrast, smaller confluent cells would show lower levels of hypoxia and *CFTR* downregulation. By one way or another, our results suggest that confluent and non-confluent endothelial cells show different levels of *CFTR* expression in culture.

Although all our results were obtained using cultured cells, and great caution is required when making inferences about *in vitro* corneal endothelium vs. intact tissue, the results presented in this paper have several consequences. Herein we demonstrated that corneal endothelial cells kept in culture are able to regulate both the cell volume and the expression and function of several genes depending on the cell confluence and the formation of cell–cell contacts. Thus, when the cells are developing, and the endothelial cell barrier is still in development, these hypertrophic cells express and activate a series of genes, but the physiological transendothelial ionic current could not be present yet. Subsequently, when the endothelial barrier has formed and the cell volume has reduced, dense cell–cell contacts would lead endothelial cells to activate the expression and function of a different set of genes, and the cells would initiate the normal ionic current that keeps the corneal stroma dehydrated and transparent. Although our results have been obtained using rabbit corneal endothelial cells with higher proliferation rates than human cells, these results may have implications for human corneal decompensation after corneal endothelial wounding and could explain why the extensive loss of endothelial cells leads to corneal edema and impaired vision. All this implies that during the clinical manage of the human cornea, the ophthalmologist should always ensure that the cells that are present in the endothelium are confluent and the normal endothelial barrier is intact. In addition, our findings could have several consequences for the development of full-thickness substitutes for the cornea by tissue engineering (Alaminos et al., 2006; Nishida, 2003).

## Acknowledgment

This work was supported by grants P06-CTS-02191 and PI-0132/2007 from the Autonomous Government of Andalusia, Spain (Junta de Andalucía).

## References

- Abraham, E.H., Breslow, J.L., Epstein, J., Chang-Sing, P., Lechene, C., 1985. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am. J. Physiol* 248, 154–164.
- Alaminos, M., Sanchez-Quevedo, M.C., Munoz-Avila, J.I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., Campos, A., 2006. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3311–3317.
- Alaminos, M., Sanchez-Quevedo, M.C., Munoz-Avila, J.I., Garcia, J.M., Crespo, P.V., Gonzalez-Andrades, M., Campos, A., 2007. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J. Cell Physiol* 211, 692–698.
- Al-Nakkash, L., Reinach, P.S., 2001. Activation of a CFTR-mediated chloride current in a rabbit corneal epithelial cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2364–2370.
- Barfort, P., Maurice, D., 1974. Electrical potential and fluid transport across the corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 19, 11–19.
- Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M., 2005. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J. Cell Sci.* 118, 2435–2440.
- Boekestein, A., Thiel, F., Stols, A.L.H., Bouw, E., Stadhouders, A., 1984. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J. Microsc.* 134, 327–334.
- Bonanno, J.A., 2003. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 69–94.
- Borgmann, S., Granitzer, M., Crabbe, J., Beck, F.X., Nagel, W., Dorge, A., 1994. Electron microprobe analysis of electrolytes in whole cultured epithelial cells. *Scanning Microsc. Suppl.* 8, 139–148.
- Bourne, W.M., Nelson, L.R., Buller, C.R., Huang, P.T., Geroski, D.H., Edelhauser, H.F., 1994. Long-term observation of morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 891–899.
- Bowler, J.M., Peart, D., Purves, R.D., Carré, D.A., Macknight, A.D., Civan, M.M., 1996. Electron probe X-ray microanalysis of rabbit ciliary epithelium. *Exp. Eye Res.* 62, 131–139.
- Brochiero, E., Dagenais, A., Privé, A., Berthiaume, Y., Grygorczyk, R., 2004. Evidence of a functional CFTR Cl<sup>-</sup> channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 287, 382–392.
- Bryant, M.R., McDonnell, P.J., 1998. A triphasic analysis of corneal swelling and hydration control. *J. Biomech. Eng.* 120, 370–381.
- Burns, R.R., Bourne, W.M., Brubaker, R.F., 1981. Endothelial function in patients with cornea guttata. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20, 77–85.
- Chen, W.C., Davis, R.L., 2006. Voltage-gated and two-pore-domain potassium channels in murine spiral ganglion neurons. *Hear Res.* 222, 89–99.
- Cid, L.P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D.I., Guggino, W.B., Cutting, G.R., 1995. Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (CLC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum. Mol. Genet.* 4, 407–413.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Crawford, K.M., Ernst, S.A., Meyer, R.F., MacCallum, D.K., 1995. NaK-ATPase pump sites in cultured bovine corneal endothelium of varying cell density at confluence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1317–1326.
- Davies, N., Akhtar, S., Turner, H.C., Candia, O.A., To, C.H., Guggenheim, J.A., 2004. Chloride channel gene expression in the rabbit cornea. *Mol. Vis.* 10, 1028–1037.
- Diecke, F.P.J., Zhu, Z., Kang, F., Kuang, K., Fischbarg, J., 1998. Sodium, potassium, two chloride cotransport in corneal endothelium: characterization and possible role in volume regulation and fluid transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 104–110.
- Fernández-Segura, E., Cañizares, F.J., Cubero, M.A., Revelles, F., Campos, A., 1997. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol. Int. J.* 21, 665–669.
- Fischbarg, J., Lim, J.J., 1974. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. *J. Physiol* 241, 647–675.
- Fischbarg, J., Maurice, D.M., 2004. An update on corneal hydration control. *Exp. Eye Res.* 78, 537–541.
- Fukami, H., Laing, R.A., Tsubota, K., Chiba, K., Oak, S.S., 1988. Corneal endothelial changes following minor trauma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 1677–1682.
- Green, K., 1991. Corneal endothelial structure and function under normal and toxic conditions. *Cell Biol. Rev.* 25, 169–207.
- Green, K., Cheeks, L., Hull, D.S., 1994. Effects of calcium channel blockers on rabbit corneal endothelial function. *Curr. Eye Res.* 13, 401–408.
- Haas, M., Ward, D.C., Lee, J., Roses, A.D., Clarke, V., D'Eustachio, P., Lau, D., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B., 1993. Localization of Shaw-related K(+) channel genes on mouse and human chromosomes. *Mamm. Genome* 4, 711–715.
- Hageman, G.S., Zhu, Z.L., Waheed, A., Sly, W.S., 1991. Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2716–2720.
- Hedbys, B.O., Mishima, S., 1962. Flow of water in the corneal stroma. *Exp. Eye Res.* 1, 262–275.
- Hirsch, M., Renard, G., Faure, J.P., Payrau, P., 1975. Proceedings: Regeneration of the rabbit corneal endothelium. A light and electron microscopic study. *Exp. Eye Res.* 20, 182–182.
- Hodson, S., 1974. The regulation of corneal hydration by a salt pump requiring the presence of sodium and bicarbonate ions. *J. Physiol* 236, 271–302.
- Hodson, S.A., 1997. Corneal stromal swelling. *Prog. Retin. Eye Res.* 16, 99–116.
- Hodson, S., Miller, F., 1976. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. *J. Physiol* 263, 563–577.
- Huang, P.T., Nelson, L.R., Bourne, W.M., 1989. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 1794–1801.
- Huff, J.W., Green, K., 1981. Demonstration of active sodium transport across the isolated rabbit corneal endothelium. *Curr. Eye Res.* 1, 113–114.
- Hunter, F., Xie, J., Trimble, C., Bur, M., Li, K.C., 2006. Rhodamine-RCA in vivo labeling guided laser capture microdissection of cancer functional angiogenic vessels in a murine squamous cell carcinoma mouse model. *Mol. Cancer* 5, 5.
- Itoh, R., Kawamoto, S., Miyamoto, Y., Kinoshita, S., Okubo, K., 2000. Isolation and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel from human corneal epithelium. *Curr. Eye Res.* 21, 918–925.
- Jongebloed, W.L., Dijk, F., Worst, J.F., 1987. Descriptive anatomy of the ageing process of the human cornea as visualized by SEM. *Doc. Ophthalmol* 67, 209–220.
- Joyce, N.C., 2003. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 359–389.
- Joyce, N.C., Mekler, B., Neufeld, A.H., 1990. In vitro pharmacologic separation of corneal endothelial migration and spreading responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 1816–1826.
- Korchev, Y.E., Gorelik, J., Lab, M.J., Sviderskaya, E.V., Johnston, C.L., Coombes, C.R., Vodyanoy, I., Edwards, C.R., 2000. Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy. *Biophys. J.* 78, 451–457.
- Krep, H., Lefurgey, A., Graves, S.W., Hockett, D., Ingram, P., Hollenberg, N.K., 1996. Elemental composition of Na pump inhibited rabbit aorta VSM cells by electron probe X-ray microanalysis. *Am. J. Physiol* 271, H514–H520.
- Laing, R.A., Leibowitz, H.M., Oak, S.S., Chang, R., Berrospi, A.R., Theodore, J., 1981. Endothelial mosaic in Fuchs' dystrophy. A qualitative evaluation with the specular microscope. *Arch. Ophthalmol* 99, 80–83.
- Lim, J.J., Fischbarg, J., 1981. Electrical properties of rabbit corneal endothelium as determined from impedance measurements. *Biophys. J.* 36, 677–695.

- Lu, L., 2006. Stress-induced corneal epithelial apoptosis mediated by K<sup>+</sup> channel activation. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 515–538.
- Matsubara, M., Tanishima, T., 1983. Wound-healing of corneal endothelium in monkey, an autoradiographic study. *Jpn. J. Ophthalmol.* 27, 444–450.
- Maurice, D.M., 1972. The location of the fluid pump in the cornea. *J. Physiol.* 221, 43–54.
- Mergler, S., Pleyer, U., 2007. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 359–378.
- Mergler, S., Dannowski, H., Bednarz, J., Engelmann, K., Hartmann, C., Pleyer, U., 2003. Calcium influx induced by activation of receptor tyrosine kinases in SV40-transfected human corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 77, 485–495.
- Metzen, E., Wolff, M., Fandrey, J., Jelkmann, W., 1995. Pericellular PO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> consumption in monolayer cell cultures. *Respir. Physiol.* 100, 101–106.
- Mimura, T., Joyce, N.C., 2006. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1387–1396.
- Nishida, K., 2003. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 22, S28–S34.
- Patel, A.J., Honoré, E., 2001. Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur. Respir. J.* 18, 221–227.
- Rae, J.L., Dewey, J., Cooper, K., 1989. Properties of single potassium-selective ionic channels from the apical membrane of rabbit corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 49, 591–609.
- Rae, J.L., Dewey, J., Cooper, K., Gates, P., 1990. A non-selective cation channel in rabbit corneal endothelium activated by internal calcium and inhibited by internal ATP. *Exp. Eye Res.* 50, 373–384.
- Rae, J.L., Shepard, A.R., 2000a. Kir2.1 Potassium channels and corneal epithelia. *Curr. Eye Res.* 20, 144–152.
- Rae, J.L., Shepard, A.R., 2000b. Kv3.3 potassium channels in lens epithelium and corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 70, 339–348.
- Rae, J.L., Watsky, M.A., 1996. Ionic channels in corneal endothelium. *Am. J. Physiol.* 270, C975–C989.
- Rick, R., Dörge, A., Beck, F.X., Thurau, K., 1983. Analysis of epithelial ion transport by X-ray microanalysis. *Scan. Electron Microsc.* 2, 801–808.
- Rick, R., Dörge, A., Beck, F.X., Thurau, K., 1986. Electron-probe X ray microanalysis of transepithelial ion transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 483, 245–259.
- Riley, M.V., Winkler, B.S., Starnes, C.A., Peters, M.I., Dang, L., 1998. Regulation of corneal endothelial barrier function by adenosine, cyclic AMP, and protein kinases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2076–2084.
- Romero, M.F., Fong, P., Berger, U.V., Hediger, M.A., Boron, W.F., 1998. Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter from rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 274, F425–F432.
- Staatz, W.D., Van Horn, D.L., 1980. The effects of aging and inflammation on corneal endothelial wound healing in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 983–986.
- Staham, P.J., Pawley, J.B., 1978. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc.* 1, 469.
- Stiemke, M.M., Edelhäuser, H.F., Geroski, D.H., 1991. The developing corneal endothelium, correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Curr. Eye Res.* 10, 145–156.
- Sun, X.C., Bonanno, J.A., 2002. Expression, localization, functional evaluation of CFTR in bovine corneal endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C673–C683.
- Sun, X.C., McCutcheon, C., Bertram, P., Xie, Q., Bonanno, J.A., 2001. Studies on the expression of mRNA for anion transport related proteins in corneal endothelial cells. *Curr. Eye Res.* 22, 1–7.
- Sun, X.C., Zhai, C.B., Cui, M., Chen, Y., Levin, L.R., Buck, J., Bonanno, J.A., 2003. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent soluble adenylyl cyclase activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in corneal endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C1114–C1122.
- Taylor, W.G., Camalier, R.F., Sanford, K.K., 1978. Density-dependent effects of oxygen on the growth of mammalian fibroblasts in culture. *J. Cell Physiol.* 95, 33–40.
- Tervo, T., Palkama, A., 1975. Electron microscopic localization of adenosine triphosphatase (NaK-ATPase) activity in the rat cornea. *Exp. Eye Res.* 21, 269–279.
- Thurau, K., Dörge, A., Mason, J., Beck, F., Rick, R., 1979a. Intracellular elemental concentrations in renal tubular cells. An electron microprobe analysis. *Klin. Wochenschr.* 57, 993–999.
- Thurau, K., Dörge, A., Rick, R., Roloff, C., Beck, F., Mason, J., Bauer, R., 1979b. Intracellular electrolyte concentrations in epithelial tissue during various functional states. *Scan. Electron. Microsc.* 2, 733–738.
- Van Horn, D.L., Sendele, D.D., Seideman, S., Bucu, P.J., 1977. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 597–613.
- Von Sallmann, L., Caravaggio, L.L., Grimes, P., 1961. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *Am. J. Ophthalmol.* 51, 955–969.
- Wang, D., Youngson, C., Wong, V., Yeger, H., Dinauer, M.C., Vega-Saenz Miera, E., Rudy, B., Cutz, E., 1996. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K<sup>+</sup> channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13182–13187.
- Wang, L., Fyffe, R.E., Lu, L., 2004. Identification of a Kv3.4 channel in corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1796–1803.
- Warley, A., 1990. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J. Microsc.* 157, 135–147.
- Warley, A., 1994. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc. Suppl.* 8, 129–137.
- Warley, A., 1997. *X-ray Microanalysis for Biologists*, first ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Watsky, M.A., Cooper, K., Rae, J.L., 1992. Transient outwardly rectifying potassium channel in the rabbit corneal endothelium. *J. Membr. Biol.* 128, 123–132.
- Whikehart, D.R., Montgomery, B., Hafer, L.M., 1987. Sodium and potassium saturation kinetics of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in plasma membranes from corneal endothelium: fresh tissue vs. tissue culture. *Curr. Eye Res.* 6, 709–717.
- Xia, Y., Haws, C.M., Wine, J.J., 1997. Disruption of monolayer integrity enables activation of a cystic fibrosis “bypass” channel in human airway epithelia. *Nat. Med.* 3, 802–805.
- Yang, D., Sun, F., Thomas, L.L., Offord, J., MacCallum, D.K., Dawson, D.C., Hughes, B.A., Ernst, S.A., 2000. Molecular cloning and expression of an inwardly rectifying K(+) channel from bovine corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2936–2944.
- Zaidi, T., Mowrey-McKee, M., Pier, G.B., 2004. Hypoxia increases corneal cell expression of CFTR leading to increased *Pseudomonas aeruginosa* binding, internalization, and initiation of inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4066–4074.
- Zhang, W., Roomans, G.M., 1998. Volume-induced chloride transport in HT29 cells studied by X-ray microanalysis. *Microsc. Res. Tech.* 40, 72–78.

# Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas

M. González-Andrades<sup>1,3</sup>, I. Garzón<sup>1</sup>, M. I. Gascón<sup>2</sup>, J. I. Muñoz-Ávila<sup>3</sup>, M. C. Sánchez-Quevedo<sup>1</sup>, A. Campos<sup>1</sup> and M. Alaminos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, E18012 Granada, Spain

<sup>2</sup>Division of Ophthalmology, University Hospital Virgen de las Nieves, Avenida Fuerzas Armadas 2, E18012 Granada, Spain

<sup>3</sup>Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, E18012 Granada, Spain

## Abstract

We have carried out a sequential study of intercellular junction formation and differentiation on human corneal substitutes consisting of an artificial corneal stroma and a corneal epithelium, developed by tissue engineering. To generate these artificial human corneas, we developed a corneal stroma substitute, using fibrin and agarose scaffolds with human keratocytes immersed within, then cultured the human corneal epithelium on top. Electron microscopy and immunofluorescence analyses revealed that artificial corneas with one or two epithelial cell layers did not show any formation of intercellular junctions. In contrast, several types of cell–cell junction, especially desmosomes, were found in multilayered mature corneal substitutes. Concomitantly, the expression of genes encoding for plakoglobin 3 (PKG3), desmoglein 3 (DSG3) and desmoplakin (DSP), zonula occludens 1 (ZO-1) and 2 (ZO-2) and connexin 37 (Cx37) was higher in multilayered artificial corneas than in immature artificial corneas, as shown by both microarray and immunofluorescence. Although expression of ZO-1, ZO-2 and Cx37 proteins was homogeneous, PKG3, DSG3 and DSP expression was restricted to the most apical cell layers in artificial corneas submerged in culture medium at all times, whereas expression was higher in intermediate cell layers, similar to normal human control corneas, when corneal substitutes are submitted to air–liquid culture techniques. These results suggest that cultured corneal substitutes submitted to air–liquid culture technique tend to form a well-developed epithelium that is very similar to the epithelium of human native corneas, suggesting that these artificial corneas could eventually be used for clinical or *in vitro* purposes. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 15 December 2008; Revised 27 February 2009; Accepted 17 March 2009

**Keywords** cornea; tissue engineering; corneal development; confocal microscopy; microarray; desmosomes; tight junction; gap junctions

## 1. Introduction

The human cornea is a multilayered transparent organ with three main layers (Reichl and Muller-Goymann, 2003). The inner layer of the cornea consists of a single stratum of corneal endothelial cells (Joyce, 2003). Next, the corneal stroma is a thick structure made of a matrix of collagen and protein–polysaccharide complexes with keratocytes immersed within. Finally,

the stratified corneal epithelium is the external barrier of the cornea, with 5–10 epithelial cell layers which are called, from the deepest to the most superficial stratum, the basal cell layer, the wing-cell layer and the apical cell layer (Lavker *et al.*, 1991). Stem cells for the corneal epithelium reside at the corneoscleral limbus (Dua and Azuara-Blanco, 2000) and it is thought that the maintenance of a healthy corneal epithelium depends on a unique population of stem cells located in the limbal basal epithelium (España *et al.*, 2003; Schermer *et al.*, 1986). These limbal stem cells have a superior proliferative capacity under both *in vivo* and *in vitro* conditions and are able to generate primary cultures

\*Correspondence to: M. Alaminos, Department of Histology, University of Granada, Avenida de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain. E-mail: malaminos@ugr.es

of corneal epithelial cells (España *et al.*, 2003; Lindberg *et al.*, 1993).

Corneal epithelium is the major limiting barrier for corneal absorption, whose cells are tightly attached by several kinds of intercellular junctions, mainly desmosomes, tight junctions and gap junctions (Hutcheon *et al.*, 2007). Among them, desmosomes emerge as essential elements that maintain the stability and three-dimensional structure of the corneal epithelium by tightly joining cells adjacent to each other (Pei and Rhodin, 1971; Resch *et al.*, 2006). Moreover, different authors have demonstrated that the presence of desmosomes is necessary for proper stratification and differentiation of the epithelium (Pei and Rhodin, 1971; Tisdale *et al.*, 1988).

Along with their role in cell attachment, desmosomes are the most important cellular sites for intermediate filament anchoring in epithelial cells. Thus, desmosomal junctions are able to create a transcellular network throughout a whole epithelium that contributes to supply mechanical strength and integrity to tissues such as the epidermis and the corneal epithelium. In addition, desmosomes are enormously dynamic structures that are modulated in response to environmental stimuli and participate in tissue remodelling during development, differentiation, wound healing and invasion (Green and Jones, 1996). Despite the important role of desmosomes in the human cornea, little is known about the process of development of these cell–cell junctions in the human corneal epithelium.

Moreover, corneal epithelial cells are firmly attached by tight junctions and gap junctions. Tight junctions are composed by integral transmembrane proteins (occludin and claudins) and membrane-associated proteins such as ZO-1, ZO-2 and ZO-3 (Ban *et al.*, 2003; Tsukita *et al.*, 2001). The role of this kind of junction is to encircle the cells just below the apical surface and thus constitute the main barrier to fluid, electrolytes, macromolecules and cells through the paracellular pathway, in a regulated manner (Yi *et al.*, 2000). Gap junctions are specialized intercellular channels connecting adjacent cells that permit and control the intercellular transit of small molecules. These structures have been implicated in diverse biological processes related to development, cellular metabolism and cellular growth control (Kumar and Gilula, 1996; Simon and Goodenough, 1998).

Human corneas can be damaged by numerous congenital or acquired diseases, and it is very common for a full-thickness allogeneic corneal transplantation to be necessary (Maurice and Singh, 1996). Therefore, the development of an efficient substitute for the human cornea by tissue engineering is one of the main challenges facing modern histological science. However, attempts to generate an efficient full-thickness artificial human corneal construct have proved unsuccessful for several reasons. On the one hand, the generation of a consistent and transparent stromal substitute that allows keratocytes to proliferate internally remains one of the unfulfilled objectives of corneal research.

Whereas synthetic polymers usually show a lack of biocompatibility and integration into the tissues (Orwin *et al.*, 2004), biological compounds are difficult to manage and polymerize. Recently, our group described a stromal substitute made of a mixture of human fibrin and agarose that allowed us to successfully develop full-thickness corneal and oral mucosa constructs by tissue engineering (Alaminos *et al.*, 2006, 2007; Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007). On the other hand, isolation and culture of human corneal endothelial cells remains a challenge for most researchers, especially when adult corneas are used for these purposes (Joyce, 2003; Tegtmeier *et al.*, 2001). For this reason, most of the corneal constructs reported to date use laboratory animal corneal cells with high endothelial proliferation capability (Alaminos *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Marchant *et al.*, 2002) or are partial human corneal substitutes lacking either the endothelial cell layer or both the endothelial and the stromal layers (Ma *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). All of these cornea models could be used to study drug transport into ocular tissues, and as an alternative to *in vivo* toxicity tests, without the need to use live laboratory animals (Chang *et al.*, 2000; Hornof *et al.*, 2005). Moreover, construction of human artificial corneas in the laboratory by tissue engineering would provide the researchers with an ideal *in vitro* model to study the whole process of epithelial differentiation and desmosomal development.

In this work, we have carried out a sequential study of development and differentiation of several types of intercellular joints in human corneal epithelium generated by tissue engineering.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Construction of a partial substitute for the human cornea

Corneal–scleral limbal rims of ca. 14 mm diameter were obtained at the University Hospital of San Cecilio, Granada, Spain, after the removal of  $\pm 7$  mm central corneal buttons for corneal transplantation. This work was approved by the local research and ethical committees and the research adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Primary cultures of corneal epithelial cells were obtained by using limbal explants, as previously described (Alaminos *et al.*, 2006). Briefly, the corneal scleral rings were cut into 2 mm<sup>2</sup>, 100  $\mu$ m thickness explants and placed epithelial side down in culture flasks containing a small amount of culture medium, to allow the explants to attach to the culture surface. Next, the explants were submerged in epithelial culture medium and allowed to grow to confluence. The epithelial culture medium was a 3:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% antibiotics, 24  $\mu$ g/ml adenine, 0.4 mg/ml

hydrocortisone, 5 mg/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 1.3 ng/ml triiodothyronine and 8 ng/ml cholera toxin. Stromal keratocytes were isolated from fragments of corneal stroma that remained attached to the sclerocorneal limbus, using collagenase I (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 6 h. The culture medium used in this case was DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen-Gibco). All cells were incubated at 37 °C in 5% carbon dioxide under standard culture conditions.

To develop a partial artificial substitute for the human cornea, we used a stroma substitute made of cultured keratocytes entrapped in a gel of human fibrin and 0.1% agarose, according to previously published methods (Alaminos *et al.*, 2006). After 24 h, the cultured corneal epithelial cells were subcultured and seeded onto the surface of the fibrin-agarose scaffold. Stratification and differentiation of the epithelial cell layer were promoted by using air-liquid culture techniques on cell culture inserts with 0.4 µm porous membranes (Transwell, Corning-Costar, Corning, NY, USA). This pore size allows the nutrients to cross the inserts but prevents migration of the cells to the other compartment. By using this system, it is possible to control the level of culture medium in which the artificial corneas are cultured and allow the epithelium to directly contact with air, whereas the artificial stroma is submerged in medium.

To analyse the time-course changes associated with cell-cell adhesion structures, bioengineered artificial corneas were sequentially analysed at different time points (days 7, 14, 21 and 28 of culture) and different differentiation and maturation stages, using parallel artificial cornea cultures, including: (a) immature samples with one and (b) two epithelial cell layers; (c) multilayered samples generated in submerged culture conditions; and (d) mature, fully differentiated samples submitted to air-liquid conditions. As normal controls, we used human native corneas from donors.

### 2.2. Microscopic evaluation of the human cornea substitutes

For light microscopy, native and bioengineered corneas were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated in an ethanol series and embedded in paraffin. Cross-sections were cut, 4 µm thick, stained with haematoxylin and eosin and examined with a light microscope.

For transmission electron microscopy (TEM), samples were fixed in cacodylate-buffered 2.5% glutaraldehyde and postfixed in 1% osmium tetroxide for 90 min. After fixation, the samples were dehydrated in increasing concentrations of acetone (30%, 50%, 70%, 95% and 100%) and then embedded in Spurr's resin and cut into ultrathin sections, using an ultramicrotome. For analysis, sections were stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscope (EM902; Carl Zeiss Meditec, Inc., Oberkochen, Germany).

### 2.3. Fluorescence immunohistochemistry

The expression of plakoglobin 3 (PKG3), desmoglein 3 (DSG3), desmoplakin (DSP), zonula occludens 1 (ZO-1), zonula occludens 2 (ZO-2) and connexin 37 (Cx37) proteins was determined by fluorescence immunohistochemistry, using paraffin-embedded tissue sections corresponding to controls and cornea constructs at different stages of epithelial stratification and differentiation. Mouse monoclonal antibodies against plakoglobin 3 (Abcam ref. AB12083, clone 15F11, Cambridge, UK; dilution 1 : 25) and desmoglein 3 (Abcam ref. AB12080, clone 5G11, dilution 1 : 25), rabbit polyclonal antibody against desmoplakin (Abcam ref. AB14418, dilution 1 : 75), ZO-1 (Sigma-Aldrich ref. HPA001637, lot R00652, dilution 1 : 35), ZO-2 (Sigma-Aldrich ref. HPA001813, lot R04235, dilution 1 : 75) and connexin 37 (Abcam ref. AB58918, GJA4, dilution 1 : 75) were used. Firstly, paraffin was removed from the tissue sections, using xylene, and the samples were rehydrated in water through a graded series of alcohols (100%, 96%, 70%, 50% and water). Then we used 0.01 M citrate buffer, pH 6.0, at 95 °C for 10 min for antigen retrieval. After blocking any unspecific binding sites using bovine serum albumin, we incubated the samples with the primary antibodies for 1 h at room temperature. Incubation with secondary antibodies was carried out for 30 min using FITC-conjugated anti-mouse antibody (dilution 1 : 500) or CY3-conjugated anti-rabbit antibody (dilution 1 : 500). Finally, the slides were counterstained with DAPI and photographed using a Leica DMI6000 confocal microscope.

### 2.4. Genome-wide gene expression analysis by high-density oligonucleotide microarrays

Comprehensive genome-wide gene expression analysis was carried out to quantify the expression of different genes with a role in the synthesis of several intercellular junctions. Total RNA corresponding to primary cultures of corneal epithelial and stromal cells and human cornea constructs was extracted using the Qiagen RNeasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), following the manufacturer's recommendations. RNA concentration and quality were determined using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total cDNA was synthesized with a T7-polyT primer and reverse transcriptase (Superscript II, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). *In vitro* transcription was carried out with biotinylated UTP and CTP (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA). Labelled nucleic acid target was hybridized (45 °C for 16 h) to Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 oligonucleotide arrays. Finally, after automated washing and staining, absolute values of expression were calculated and normalized from the scanned array, using Affymetrix software. For the analysis of genes with a role in the synthesis of intercellular junctions, we selected all probe-sets corresponding to PKG3, DSG3, DSP, ZO-1, ZO-2 and Cx37. The expression



of all these genes was normalized using the bona fide housekeeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as a control.

In this work, we analysed four corneal substitutes corresponding to mature artificial corneas submitted to air–liquid culture, four primary cultures of epithelial cells and four primary cultures of stromal keratocytes. All primary cell cultures corresponded to the first passage of cells kept in culture. The gene expression levels shown by stromal keratocytes were considered as baseline or background expression levels (negative controls), since these cells do not show desmosomes, tight junctions or gap junctions *in vivo*. Statistical comparison of the expression levels of the analysed genes between corneal epithelial cells and corneal substitutes was carried out using the Mann–Whitney U-test.

### 3. Results

#### 3.1. Histological evaluation of bioengineered partial corneal substitutes

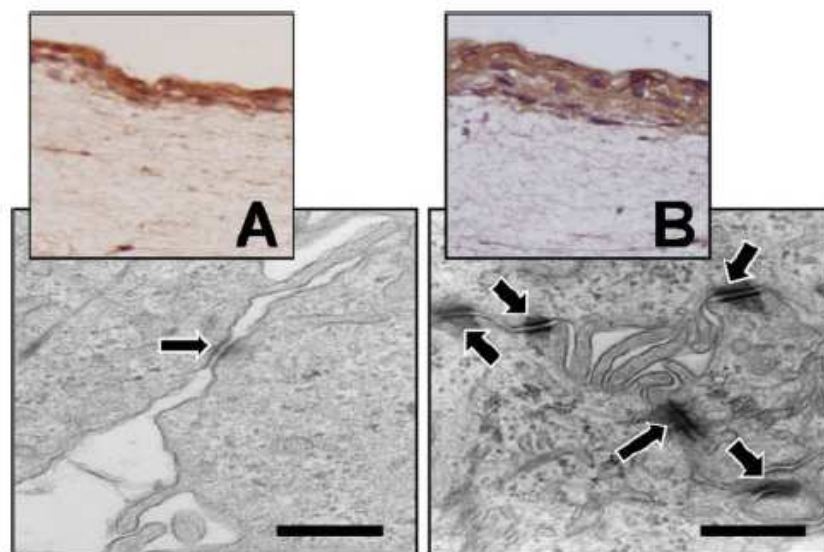
Light microscopy evaluation of the partial substitutes of the human cornea generated in the laboratory by tissue engineering demonstrated a progressive, sequential development and differentiation of the corneal epithelium. On the other hand, TEM analysis of the immature corneal substitutes with one or two epithelial cell layers did not show any intercellular junctions. Then, when samples started to stratify, some desmosomes began to appear, although many of them were rudimentary (Figure 1A). Finally, mature corneal substitutes showed a well-developed, stratified epithelium

which presented numerous well-developed intercellular junctions (Figure 1B). Desmosomes were predominant among other cellular joints such as tight junctions or gap junctions.

#### 3.2. Fluorescence immunohistochemistry

Fluorescence immunohistochemistry evaluation of normal human native corneas demonstrated the presence of abundant intercellular junctions in the normal corneal epithelium. The immunolocalization of all junctional proteins (PKG3, DSG3, DSP, ZO-1, ZO-2 and Cx37) in the native normal stratified epithelium showed a regular distribution of the signal among all epithelial cell layers (Figures 2, 3). However, a preferentially more intense protein expression in the middle layers of the epithelium was found for the three desmosome proteins (PKG3, DSG3 and DSP) (Figure 2).

Regarding our artificial corneas, our analysis demonstrated the presence of numerous cell–cell junctions (desmosomes, tight junctions and gap junctions) in the bioengineered corneal epithelium. Initial immature cornea substitutes with one or two epithelial cell layers on top did not significantly express any of the analysed proteins, suggesting that no intercellular junction formation took place during the initial stages of epithelial stratification. However, when artificial corneal epithelium reached three or four layers of stratification immersed in culture medium, strong expression of plakoglobin 3, desmoglein 3 and desmoplakin was detected, especially in the superficial cell layers of the epithelium (Figure 2), whereas a regular expression of proteins of tight and gap junctions (ZO-1, ZO-2 and Cx37) was found throughout the epithelium (Figure 3).



**Figure 1.** Light and transmission electron microscopy (TEM) analysis of partial human cornea substitutes developed by tissue engineering. (A) Light microscopy image of an immature corneal substitute generated under submerged culture conditions (top) and detail of a not fully formed desmosomal junction corresponding to the same sample obtained by TEM (bottom). (B) Light microscopy image of a fully differentiated sample submitted to air–liquid culture conditions (top) and TEM image of the same artificial cornea showing the presence of several well-developed desmosomes (bottom). Desmosomes are labelled with arrows. Bars = 1  $\mu$ m

## Intercellular junctions in artificial corneas

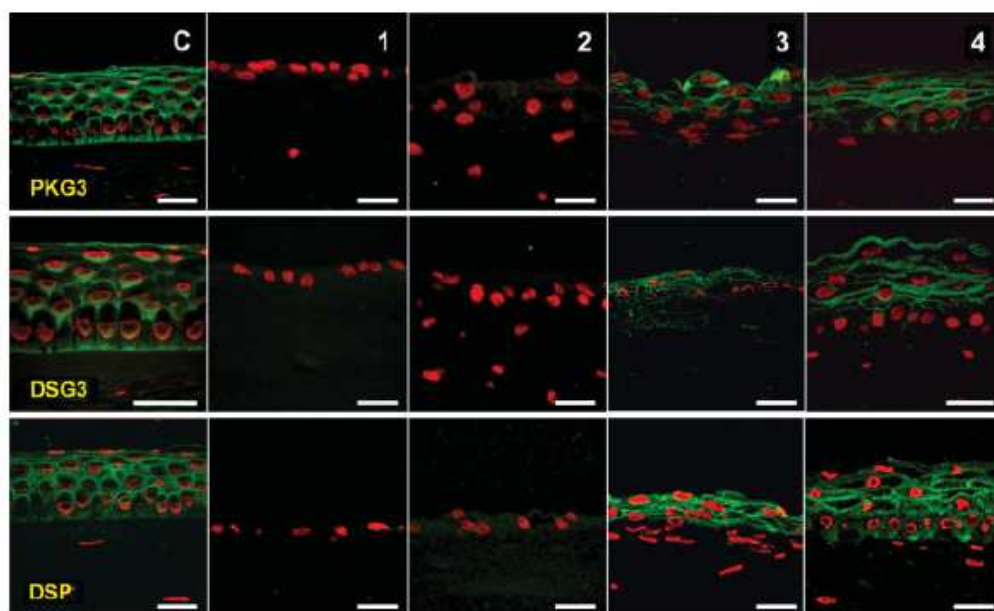


Figure 2. Immunofluorescence analysis of native normal human corneas and bioengineered corneal substitutes using plakoglobin 3 (PKG3), desmoglein 3 (DSG3) and desmoplakin (DSP) antibodies. Green signals correspond to the desmosome proteins, whereas all nuclei are stained in red. C, native normal human control corneas; 1, immature bioengineered human corneas with one layer of epithelial cells on top; 2, immature corneas with two or three epithelial cell layers; 3, bioengineered human corneas with a multilayered epithelium kept under submerged culture conditions; 4, multilayered samples submitted to air–liquid culture conditions. Bars = 30  $\mu$ m

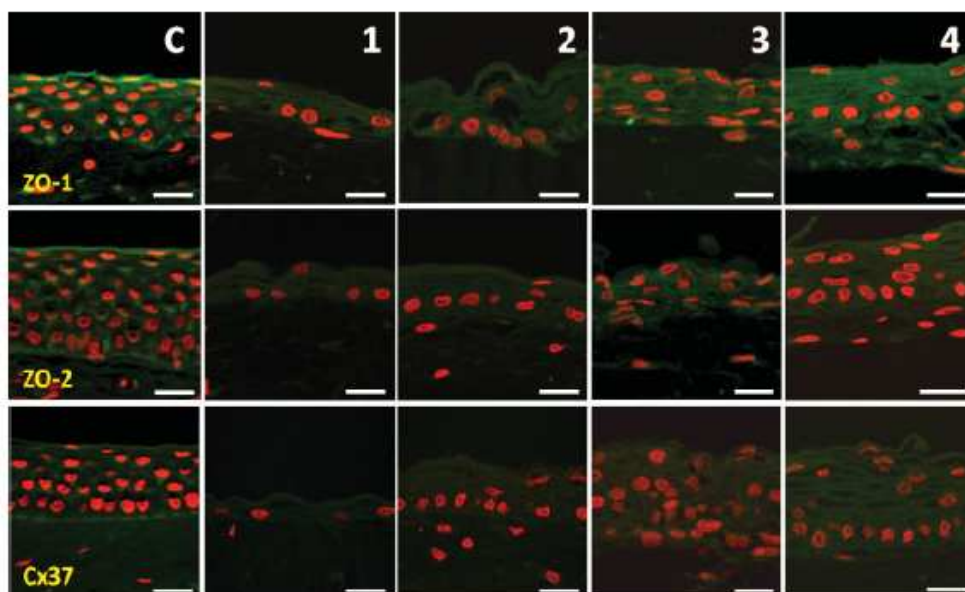


Figure 3. Immunofluorescence analysis of native normal human corneas and bioengineered corneal substitutes, using zonula occludens 1 (ZO-1), zonula occludens 2 (ZO-2) and connexin 37 (Cx37) antibodies. Green signals correspond to the proteins of the intercellular junctions, whereas all nuclei are stained in red. C, native normal human control corneas; 1, immature bioengineered human corneas with one layer of epithelial cells on top; 2, immature corneas with two or three epithelial cell layers; 3, bioengineered human corneas with a multilayered epithelium kept under submerged culture conditions; 4, multilayered samples submitted to air–liquid culture conditions. Bars = 30  $\mu$ m

Finally, when the air–liquid culture technique was used, the staining pattern found in our artificial cornea model was very similar to the expression displayed by native controls. In short, the epithelium of the human cornea substitutes showed regular and homogeneous expression of ZO-1, ZO-2 and Cx37, as is the case of

the human native cornea (Figure 3). However, expression of the three proteins with a role in desmosome formation was heterogeneous: whereas the basal cell layer did not express any of the desmosomal proteins, the middle cell layers of the epithelium showed a strong signal for PKG, DSG3 and DSP (Figure 2). As in the case of the human

native control corneas, our bioengineered epithelium submitted to air–liquid conditions did not show any significant desmosomal protein expression in the most apical cell layers.

### 3.3. Gene expression analysis

Comprehensive gene expression analysis of primary corneal cell cultures and bioengineered corneal substitutes demonstrated that the mRNA expression of the genes encoding for plakoglobin 3, desmoglein 3 and desmoplakin was higher in our artificial corneas than in primary cultures of corneal epithelial cells (average expression of 2391.7, 3671.6 and 5136.2 fluorescent units, respectively, for artificial corneas and 1951.1, 2027.0 and 2725.0 fluorescent units, respectively, for epithelial primary cultures) (Figure 4A). The differences were statistically significant for the three analysed genes ( $p = 0.029$  for the Mann–Whitney U-test). As expected, primary cultures of human stromal keratocytes showed very low levels of expression of plakoglobin 3, desmoglein 3 and desmoplakin (20.6, 6.8 and 483.5 fluorescent units, respectively) (Figure 4).

Regarding tight and gap junctions proteins, our microarray analysis showed that the expression of all genes encoding for the three proteins analysed in this work (ZO-1, ZO-2 and Cx37) was higher in the artificial corneas (82.5, 408.0 and 245.3 fluorescent units, respectively) than in the primary cultures of epithelial cells (2.8, 229.2 and 116.0 fluorescent units, respectively) and stromal keratocytes (2.1, 186.4 and 94.2 fluorescent units, respectively) (Figure 4B). Differences between epithelial cells and bioengineered corneas were statistically significant for the three analysed genes ( $p = 0.029$  for the Mann–Whitney U-test).

## 4. Discussion

Corneal epithelium is the first barrier that protects the integrity and functionality of the corneal stroma. This

barrier should not only avoid the loss of water and electrolytes to the external medium but also protect the intraocular contents from environmental aggression. For the corneal epithelium to act as a protective barrier, it is essential that (a) the epithelium be properly stratified, and (b) epithelial cells be tightly joined by intercellular junctions.

In this context, human corneal epithelium developed in the laboratory by tissue engineering should mimic the properties of normal native epithelium and, thus, it should act as a tight barrier maintaining tissue integrity. Therefore, analysing the presence and types of intercellular junctions developing in the stratified epithelium obtained by tissue engineering and comparing those to normal epithelium would be very important before clinical use.

In this study we have developed a partial substitute for the human cornea, based on the same sequential culture techniques that we previously optimized for the rabbit cornea (Alaminos *et al.*, 2006). In order to do so, human corneal epithelial cells and stromal keratocytes were isolated and cultured from small biopsies of corneal limbus. Once the human cells were isolated, corneal epithelial cells were seeded on top of a biological substitute of the corneal stroma, made of a mixture of fibrin and 0.1% agarose with keratocytes entrapped within. In contrast with collagen hydrogels, fibrin–agarose scaffolds did not tend to contract and sustained a functional epithelium whose cells showed a good degree of attachment and differentiation.

In normal conditions, the process of stratification of the corneal epithelium occurs not only during the normal embryonic development of the cornea but also as part of the process of corneal wound healing. In most cases, a monolayer epithelium is present in the early stages of both corneal development and corneal healing (Pei and Rhodin, 1971; Suzuki *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003). Subsequently, during the physiological process of corneal development and corneal repair, basal epithelial cells proliferate and migrate to form new cell layers until a multilayered epithelium with five or six cell layers is obtained. Interestingly, the same phenomenon

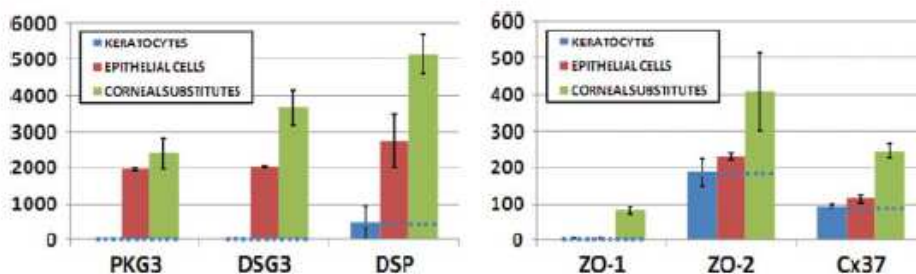


Figure 4. Average mRNA expression of the genes analysed in this study, using mRNA microarrays in primary cultures of human corneal keratocytes and human corneal epithelial cells and for bioengineered human corneal substitutes with multilayered epithelium. (Left) mRNA expression of genes encoding for plakoglobin 3 (*PKG3*), desmoglein 3 (*DSG3*) and desmoplakin (*DSP*). (Right) Expression for zonula occludens 1 (*ZO-1*), zonula occludens 2 (*ZO-2*) and connexin 37 (*Cx37*) genes. The expression of all these genes was normalized using the bona fide house-keeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as a control. Since stromal keratocytes were used as negative controls, baseline levels corresponding to keratocyte expression are shown in dotted lines

was observed in our artificial corneal constructs at the initial and later stages of maturation and differentiation. This suggests that our corneal constructs resemble the histological structure of native normal human corneal epithelium and that the process of epithelial stratification occurs through a physiological process of development (Beuerman and Pedroza, 1996; Cowin *et al.*, 1984; Chung *et al.*, 1992).

Additionally, our artificial corneal substitutes developed by tissue engineering revealed that the expression of several proteins with a role in the synthesis of intercellular junctions was directly dependent on the level of epithelial stratification. Our results showed that there was no expression of any desmosome, tight junction and gap proteins in monolayer, undifferentiated epithelium, as is the case in the embryonic stages of native cornea development, in which artificial monolayered epithelium does not express any desmosomal structures (Zhang *et al.*, 2003). One possible explanation for the fact that most intercellular junctions are absent from both monolayer native and bioengineered immature epithelia could be that basal cells need to actively proliferate and migrate to suprabasal corneal layers.

In contrast, when our bioengineered corneal epithelium reached stratification and maturation, we were able to demonstrate by TEM the presence of abundant well-developed intercellular joints, especially desmosomes. Concomitantly, the expression of proteins of the different types of cell–cell junctions, as determined by microarray and immunofluorescence, was significantly higher in the stratified epithelium in comparison to immature monolayer epithelium. Regarding desmosomal synthesis, we found that the expression profiles of the three desmosome proteins analysed here (plakoglobin 3, desmoglein 3 and desmoplakin) were very similar for each maturation state, which suggests that the synthesis of this kind of intercellular junction occurs in a coordinated manner, resembling the embryonic development of the human cornea. In contrast, Messent *et al.* (2000) demonstrated that desmoglein 3 is not overexpressed during the process of corneal wound healing. All these results imply that desmosome development follows the stratification process, showing different patterns of expression depending on the stratification stage, and that our corneal constructs exhibit a stratification process similar to that of normal embryonic cornea development. On the other hand, the homogeneous and regular expression of all the components of tight and gap junctions considered in this work (ZO-1, ZO-2, Cx37) suggests that the expression pattern of these intercellular junctions is diffuse, and that the presence of tight and gap junctions throughout the epithelium of the corneal substitutes is ubiquitous. These results are in agreement with previous reports by Ban *et al.* (2003), showing that the synthesis of tight junctions on human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane using air-lifting techniques was homogeneous, and by Ko *et al.* (2008), who demonstrated that co-culture with corneal keratocytes is important for

the corneal epithelium to efficiently develop several types of tight junctions *in vitro*.

Conversely, our findings demonstrated that incubation of the artificial corneas in direct contact with air (air–liquid culture technique) was necessary in order for the epithelium to fully mature and differentiate. Therefore, samples with a stratified epithelium that had been kept submerged at all times showed a characteristic suprabasal desmosome expression pattern that notably differed from native control corneas and from artificial corneas submitted to the air–liquid culture technique (Chang *et al.*, 2000). In contrast, expression of tight and gap junctions proteins was similar to that of control corneas at all times. Desmosomal pattern of expression showing a greater intensity of staining in the outer layers has been previously described during normal embryonic corneal development. According to Cowin *et al.* (1984), this pattern is typical of non-keratinizing epithelium. It is possible that, when the stage of three or four cell layers is reached, the most apical cell layers have already synthesized abundant cell–cell junction proteins, such as desmosome glycoproteins, in order to keep distal cells attached. In contrast, native human corneas and our most mature corneal constructs submitted to the air–liquid technique showed that desmosomes were preferentially found at the cell membrane of middle-layer cells; however, superficial cells at the most apical cell layers expressed significantly lower amounts of desmosome proteins. Our hypothesis to explain this fact is based on the necessity of sloughing the outermost superficial cell layer to the extracellular space in order to maintain epithelial cell proliferation and renovation. After both native and artificial corneas reached five or six cell layers, the most apical cell layer could break some cell–cell joints, so that the cell can be sloughed. In contrast, suprabasal cells could develop abundant cell–cell adhesion structures at the same time as they migrate to more apical cell layers, due to cell proliferation at the basal cell layer. For all the aforementioned reasons, we advocate the use of air–liquid culture techniques as a way to promote full differentiation of the artificial corneal epithelium before clinical use.

All these results suggest that cultured corneal epithelial cells submitted to the air–liquid culture technique tended to adhere and form a well-developed epithelium on top of the stromal substitutes that is similar to the epithelium of normal native corneas. For that reason, it is likely that the human corneal substitutes developed in this study could possibly be used as efficient partial substitutes of the human cornea. *In vivo* studies are needed to confirm this statement.

## Acknowledgements

This work was supported by Grant No. FIS 08/614 from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) and by Grant No. SAS PI0132/2007 from the Junta de Andalucía.

## References

- Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, *et al.* 2006; Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 3311–3317.
- Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, *et al.* 2007; Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* **1**: 350–359.
- Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, *et al.* 2003; Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* **76**: 735–743.
- Beuerman RW, Pedroza L. 1996; Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech* **33**: 320–335.
- Cowin P, Matthey D, Garrod D. 1984; Distribution of desmosomal components in the tissues of vertebrates, studied by fluorescent antibody staining. *J Cell Sci* **66**: 119–132.
- Chang JE, Basu SK, Lee VH. 2000; Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* **17**: 670–676.
- Chen J, Li Q, Xu J, *et al.* 2005; Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs* **29**: 104–113.
- Chung EH, Bukusoglu G, Zieske JD. 1992; Localization of corneal epithelial stem cells in the developing rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**: 2199–2206.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. 2000; Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* **44**: 415–425.
- Espana EM, Romano AC, Kawakita T, *et al.* 2003; Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4275–4281.
- Green KJ, Jones JC. 1996; Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J* **10**: 871–881.
- Hornof M, Toropainen E, Urtti A. 2005; Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm* **60**: 207–225.
- Hutcheon AE, Sippel KC, Zieske JD. 2007; Examination of the restoration of epithelial barrier function following superficial keratectomy. *Exp Eye Res* **84**: 32–38.
- Joyce NC. 2003; Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* **22**: 359–389.
- Ko JA, Liu Y, Yanai R, *et al.* 2008; Upregulation of tight-junctional proteins in corneal epithelial cells by corneal fibroblasts in collagen vitrigel cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 113–119.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996; The gap junction communication channel. *Cell* **84**: 381–388.
- Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, *et al.* 1991; Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**: 1864–1875.
- Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. 1993; *In vitro* propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**: 2672–2679.
- Ma DH, Yao JY, Yeh LK, *et al.* 2004; *In vitro* antiangiogenic activity in *ex vivo* expanded human limbal corneal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 2586–2595.
- Marchant JK, Zhang G, Birk DE. 2002; Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res* **75**: 683–694.
- Maurice DM, Singh T. 1996; The fate of scleral grafts in the cornea. *Cornea* **15**: 204–209.
- Messent AJ, Blissett MJ, Smith GL, *et al.* 2000; Expression of a single pair of desmosomal glycoproteins renders the corneal epithelium unique amongst stratified epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 8–15.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, *et al.* 2004; Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77**: 379–385.
- Orwin EJ, Lee S, Raub C, *et al.* 2004; Optical coherence microscopy for the evaluation of a tissue-engineered artificial cornea. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2**: 1218–1221.
- Pei YF, Rhodin JA. 1971; Electron microscopic study of the development of the mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol* **10**: 811–825.
- Reichl S, Muller-Goymann CC. 2003; The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* **250**: 191–201.
- Resch MD, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, *et al.* 2006; Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 1853–1861.
- Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, *et al.* 2007; Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* **22**: 631–640.
- Schermer A, Galvin S, Sun TT. 1986; Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* **103**: 49–62.
- Simon AM, Goodenough DA. 1998; Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* **8**: 477–483.
- Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. 2000; Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 2495–2500.
- Tegtmeyer S, Papantoniou I, Muller-Goymann CC. 2001; Reconstruction of an *in vitro* cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* **51**: 119–125.
- Tisdale AS, Spurr-Michaud SJ, Rodrigues M, *et al.* 1988; Development of the anchoring structures of the epithelium in rabbit and human fetal corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**: 727–736.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001; Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 285–293.
- Yang J, Yamato M, Nishida K, *et al.* 2006; Corneal epithelial stem cell delivery using cell sheet engineering: not lost in transplantation. *J Drug Target* **14**: 471–482.
- Yi X, Wang Y, Yu FS. 2000; Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 4093–4100.
- Zhang L, Deng M, Kao CW, Kao WW, Xia Y. 2003; MEK kinase 1 regulates c-Jun phosphorylation in the control of corneal morphogenesis. *Mol Vis* **9**: 584–593.

# UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240–400 nm Range

Ana-Maria Ionescu, MSc,\* Juan de la Cruz Cardona, MSc,\* Miguel González-Andrades, MD,†‡  
Miguel Alaminos, MD, PhD,† Antonio Campos, MD, PhD,† Enrique Hita, PhD,\* and  
María del Mar Pérez, PhD\*

**Purpose:** To determine the UV absorbance of a bioengineered human corneal stroma construct based on fibrin and fibrin–agarose scaffolds in the 240–400 nm range.

**Methods:** Three types of artificial substitutes of the human corneal stroma were developed by tissue engineering using fibrin and fibrin with 0.1% and 0.2% agarose scaffolds with human keratocytes immersed within. After 28 days of culture, the UV absorbance of each sample was determined using a spectrophotometer. The thickness of corneal stroma samples was determined by light microscope.

**Results:** For all the 3 types of corneal stroma substitutes studied, the range of the UV absorbance values was similar to that of the native human corneal stroma, although the fibrin with 0.1% agarose stroma substitute had the best UV filtering properties. The higher UV absorbance of the artificial substitute of the human corneal stroma was in the UV-B and -A ranges, suggesting that these artificial tissues could have potential clinical usefulness and proper UV light-absorption capabilities.

**Conclusion:** Our data suggest that the bioengineered human corneal substitute of fibrin with 0.1% agarose is an effective absorber of harmful UV radiation and could therefore be potentially useful.

**Key Words:** UV radiation, absorbance, tissue engineering, corneal stroma

(*Cornea* 2010;29:895–898)

**B**ecause of the ozone depletion, the amount of the UV-B radiation in the atmosphere has increased over the last decades. The eye, as an external organ, is directly exposed to the penetration of this UV-B radiation.<sup>1</sup> The outer envelope of the eye is formed by 2 connective tissues: the cornea and the

sclera. The human cornea is a transparent tissue responsible for the most of the refractive power of the eye, allowing the incoming light to reach the retina. It plays a major role in the absorbance of UV light and protection of the inner eye against the oxidative injury. The healthy cornea is a multilayered tissue with 3 major cell layers: the external epithelium, the stroma, and the inner endothelium. In terms of UV absorption, the corneal epithelium acts as a UV-B filter, mainly because of its ascorbate content.<sup>2,3</sup>

Podskochy<sup>4</sup> previously showed that the corneal epithelium serves to protect the deeper corneal structures against UV radiation damage, probably by absorbing a substantial amount of the UV radiation energy applied to the eye. This suggestion is particularly important because photorefractive keratectomy, where the epithelium, Bowman layer, and some of the anterior stroma are removed by excimer laser, has become a routine ophthalmic procedure. After photorefractive keratectomy, the remainder of the corneal stroma is left unprotected against UV radiation, at least temporarily, until the epithelium is healed.<sup>5</sup> Also they show that the epithelium and Bowman membrane have significantly higher absorption coefficients than the stroma in UV spectra shorter than 300 nm, but, according to their calculations, the stroma has greater absorbance in this UV range, due mainly to its thickness, which is more than 10 times higher than that of the other layers. Kolozsvari et al<sup>5</sup> found that the stroma is responsible for approximately 70%–75% of the UV absorbance of the cornea.

The exposure of the cornea to UV irradiation induces pathologic changes in its structure.<sup>6,7</sup> Acute exposure of the cornea to UV radiation results in the formation of photophthalmia, whereas chronic repeated exposure of the eye results in keratopathies that affect the epithelium and the anterior part of the corneal stroma. In addition to these pathologic changes, all corneal layers can be damaged by several other pathologies that could lead to blindness. Currently, the only effective treatment for most of the severe diseases of the cornea is the allogenic transplant of the affected organ. Nevertheless, corneal transplantation has several drawbacks, including the possibility of rejection of the transplanted cornea.<sup>8</sup>

In this context, several researchers have focused their efforts in the development of an artificial substitute of the cornea by tissue engineering.<sup>9–13</sup> Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function

Received for publication June 26, 2009; revision received October 28, 2009; accepted November 1, 2009.

From the \*Laboratory of Biomaterials Optics, Department of Optics, University of Granada, Granada; †Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada; and ‡Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

Supported by grant number FIS 08/614 from the Spanish Ministry of Science (Instituto de Salud Carlos III) and by grant number SAS P10132/2007 from the regional government of Andalusia (Junta de Andalucía).

Reprints: Dr. María del Mar Pérez, University of Granada, Spain, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva s/n, Mecenas Building, Granada, Granada 18071, Spain (e-mail: mmperez@ugr.es).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

or even a whole organ.<sup>14</sup> These techniques make it possible to develop several types of bioengineered tissues that could be used for clinical purposes and disease modeling.<sup>15</sup> Because native tissues are 3-dimensional structures, construction of efficient tissue substitutes depends strongly on the use of scaffolds that in structure must resemble the extracellular matrix of the native tissues, but creation of 3-dimensional scaffolds that mimic the structure of the human cornea is a major bioengineering challenge. In this regard, in vitro reproduction of the corneal stroma is extremely difficult because very few biomaterials are able to fulfill the biomechanical and optical requirements of the native corneal stroma. So far, several biomaterials have been used as biological substitutes of the corneal stroma, including collagen,<sup>16,17</sup> chitosan,<sup>18</sup> polyglycolic acid,<sup>19</sup> and fibrin.<sup>20</sup> Recently, we designed a novel translucent biomaterial based in a mixture of human fibrin and agarose that allowed us to develop in vitro substitutes of the rabbit cornea and the human oral mucosa,<sup>21–23</sup> although the absorbance of the UV radiation of this novel biomaterial has not been determined to date. It is essential that the new biomaterials used for the construction of corneal substitutes by tissue engineering ensure proper functionality in UV range.

The purpose of the present study was to determine the UV-A (330–400 nm), -B (280–330 nm), and -C (240–280 nm) absorbance of the corneal stroma substitutes and thus to reveal the importance of these novel biomaterials in the protection against excessive UV radiation.

## MATERIALS AND METHODS

Primary cultures of human keratocytes were generated as previously described.<sup>9</sup> Stromal keratocytes were isolated from small fragments of full-thickness cornea that remained attached to the sclerocorneal limbus, using collagenase I (Invitrogen-Gibco) at 37°C for 6 hours. Once the cells had been harvested by centrifugation, stromal keratocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 4 mM L-glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen-Gibco). All cells were incubated at 37°C in 5% carbon dioxide under standard culture conditions.

We developed 3 types of bioengineered corneal stroma substitutes (Fig. 1): (a) human fibrin stromas, (b) human fibrin and 0.1% agarose stromas, and (c) human fibrin and 0.2% agarose stromas, all of them with human keratocytes immersed within. In the case of the cellular stromas, cultured keratocytes

were subcultured using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich), and an average of 250,000 cells were added to 25 mL of scaffold mixture immediately before inducing the polymerization of the artificial stroma. Fibrin was obtained from frozen plasma of human blood donations (kindly provided by Fernández-Montoya, Human Tissue Bank of Granada), and type VII agarose was purchased from Sigma-Aldrich. In all cases, tranexamic acid (Amchafibrin; Fides Ecopharma, Valencia, Spain) was used to prevent gel fibrinolysis, whereas fibrin polymerization was induced by adding 1 mL of 0.025 mM CaCl<sub>2</sub> to the mixture.

After polymerization, 15 mL of culture medium were added to the surface of the scaffolds, and the bioengineered corneal stromas were incubated at 37°C in 5% carbon dioxide. Samples used in this work corresponded to artificial stromas at the fourth week of development in culture. Once removed from incubation, their thickness was determined by using a Nikon Eclipse 90i light microscope.

The dependence of the incident and transmitted light intensity of the samples on the wavelength was measured using an OSM-400 UV/VIS spectrophotometer avoiding the light scattering. The absorbance (*A*) was computed by the following equation:

$$I = I_0 10^{-A} \Rightarrow A = \lg \frac{I_0}{I}$$

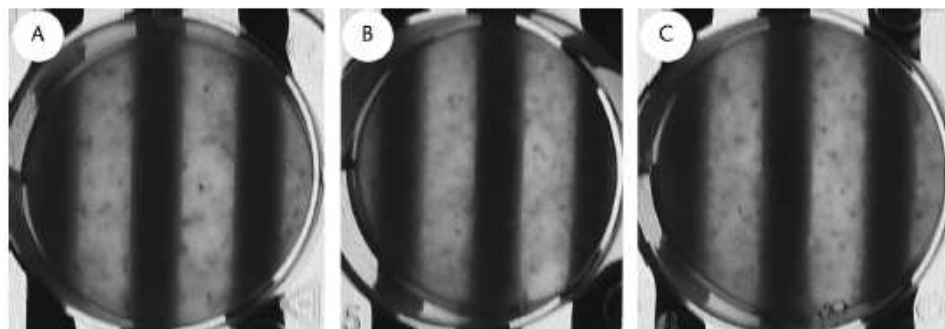
where  $\lg(I_0/I)$  corresponds to the logarithm of the incident light intensity divided by the transmitted light intensity. The absorbance is not a characteristic material constant; therefore, we calculated the absorption coefficient ( $\mu_a$ ) of the each analyzed sample using the relation

$$I = I_0 10^{-A} = I_0 \exp(-\mu_a d) \Rightarrow \mu_a = \frac{A}{d \lg e}$$

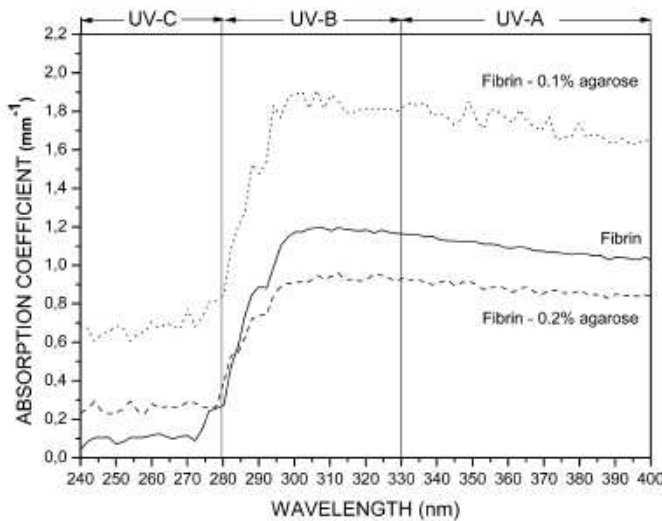
where *d* is the thickness of the sample.

## RESULTS

Figure 2 shows the absorption coefficient of the bioengineered constructs as a function of wavelength in the range of 240–400 nm. It seems that the absorption coefficient of the construct of fibrin with 0.1% agarose concentration is higher than that of the construct of fibrin, which, in turn, is higher than the absorption coefficient of the fibrin construct with a greater agarose concentration (0.2%). The important UV-A, -B, and -C wavelength ranges are also indicated (Fig. 2). It can be seen that the absorption coefficient of all 3 types of



**FIGURE 1.** Macroscopical appearance of the samples analyzed in this work. A, Fibrin corneal stroma substitute. B, Fibrin-0.1% agarose corneal stroma substitute. C, Fibrin-0.2% agarose corneal stroma substitute. All samples are shown over a black and white high-contrast pattern.

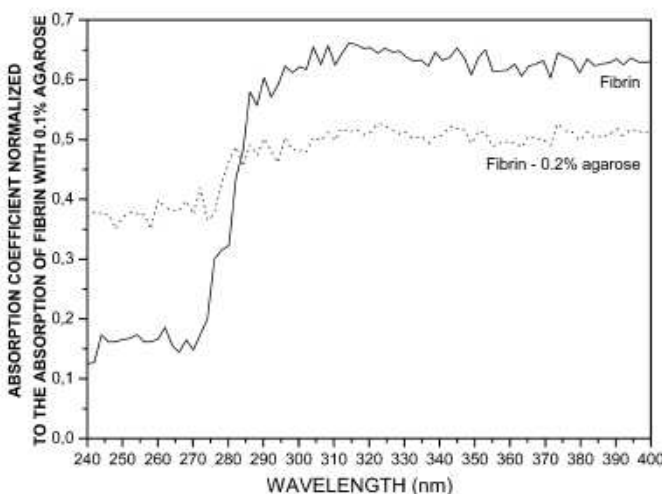


**FIGURE 2.** The absorption coefficient of the corneal stroma construct as a function of wavelength in the range of 240–400 nm.

constructs has an almost constant behavior in the UV-C wavelength range, increases with increasing wavelength until 300 nm, and slightly decreases for larger wavelengths.

From Figure 2, we calculated the normalized absorption coefficients of the fibrin and fibrin with 0.2% agarose constructs compared with the coefficient of the fibrin with the 0.1% agarose construct (Fig. 3) because we considered the latter a reference cornea construct in previous works.<sup>9,24</sup> The absorption coefficient of the fibrin with 0.1% agarose concentration stroma substitute is approximately 1.5–9 times higher than the rest of the substitutes below 300 nm wavelength. For the 300–330 nm range, the normalized coefficient values are around 0.6 and 0.65, whereas for the UV-A range, a slight separation of these values begins.

According to our calculations, the trend of the spectral distribution of the absorbance is similar to one of the



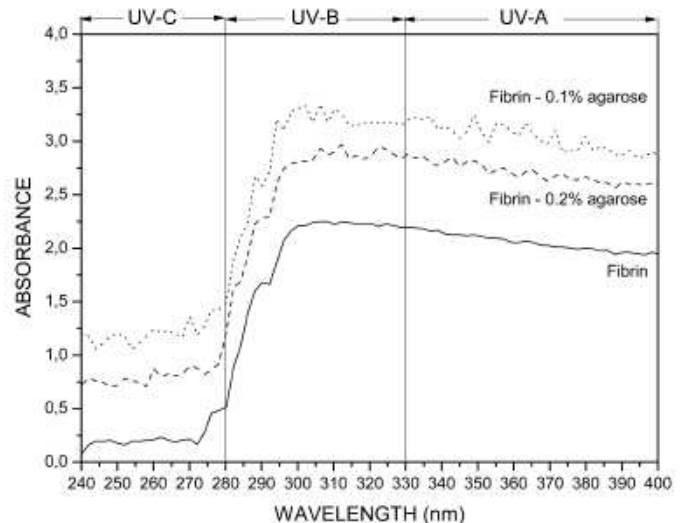
**FIGURE 3.** The absorption coefficient of fibrin and fibrin–0.2% agarose constructs divided by the absorption coefficient of the fibrin–0.1% agarose as a function of wavelength.

absorption coefficient, but the order of the absorbance values in the UV-B and UV-A wavelength range for the artificial substitute of fibrin with 0.2% agarose concentration changed with respect to the order of the absorption coefficient values (Fig. 4). This is presumably because of minor thickness differences between the tissue samples. Nevertheless, fibrin with the 0.1% agarose concentration construct displays higher absorbance values. It can be seen clearly in the transmission values (Fig. 5) as a function of wavelength.

## DISCUSSION

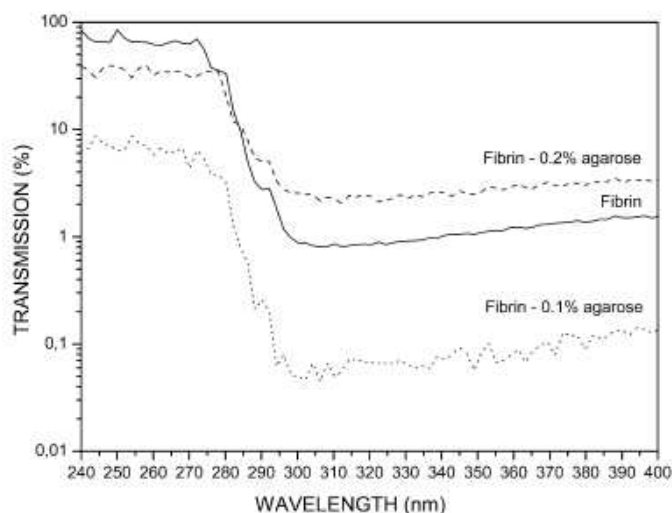
The degree of damage provoked by acute exposure to UV radiation depends on several factors, such as the spectrum of UV radiation applied and exposure duration.<sup>25–27</sup> There are only a limited number of studies concerning the absorption of UV radiation in different layers of the cornea. Some studies<sup>28,29</sup> have found that wavelengths below 290 nm are almost completely absorbed by the epithelium and do not penetrate the deeper, underlying structures of the eye. In contrast, the middle UV wave band (300–320 nm) is known to be absorbed by the corneal stroma and lens. However, another study<sup>30</sup> has shown no difference in UV absorption between the epithelium and the stroma. More recently, Kolozvári et al<sup>5</sup> reported that UV-B (280–320 nm) absorption is 1.8 times higher in the anterior 100  $\mu\text{m}$  of the human cornea than in the posterior layers and that the epithelium and Bowman membrane have significantly higher absorption coefficients than the stroma in UV spectra shorter than 310 nm, but according to their calculations, the stroma has greater absorbance in this UV range, due mainly to its thickness, which has more than 10 times the thickness of the other layers.

Here, we report the structurally dependent UV absorbance of various bioengineered human corneal stroma substitutes between 240 and 400 nm of wavelength. For all the 3 types of corneal stroma substitutes studied, the range of the absorbance values (Fig. 4) was similar to that of the human



**FIGURE 4.** The absorbance of fibrin, fibrin–0.1% agarose, and fibrin–0.2% agarose corneal substitutes as a function of wavelength in the range of 240–400 nm.





**FIGURE 5.** The transmission of the fibrin, fibrin-0.1% agarose, and fibrin-0.2% agarose constructs as a function of wavelength.

corneal stroma,<sup>5</sup> suggesting that these artificial tissues could have potential clinical usefulness and proper UV light-absorption capabilities. Strikingly, the fibrin with the 0.1% agarose construct had higher UV absorbance than did the other artificial stromas analyzed here, supporting the use of fibrin-0.1% agarose scaffolds for the construction of artificial corneas by tissue engineering.<sup>9,24</sup>

The higher absorbance of the artificial substitute of the human corneal stroma was found for the UV-B and -A ranges, especially for UV-B. These results suggest that our bioengineered corneal stromas could be particularly efficient in preventing damage by UV-B radiation, which is considered to be the most dangerous for the human eye.<sup>31</sup> According to previous studies by Kolozsvari et al,<sup>5</sup> most of the UV-C light that reaches the cornea is filtered by the most external epithelium and Bowman layers of the cornea, which have the highest absorption coefficient. For that reason, the generation of full-thickness artificial corneal substitutes by tissue engineering could probably have UV-A, UV-B, and UV-C filtering efficiency. On the basis of all these data, it could be argued that the fibrin with 0.1% agarose corneal substitutes has the best UV filtering properties.

Previous studies demonstrated that our fibrin-agarose cornea model fulfills most of the requirements for the construction of an artificial cornea by tissue engineering, especially those related to the development and differentiation of the epithelial cells grown on the surface of the scaffold.<sup>9,24</sup> However, for these bioengineered corneas to be potentially useful from a clinical standpoint, the levels of biocompatibility, oxygen and protein permeability, strength, transparency, and the rest of features that define the human native cornea should be additionally determined in these artificial tissues.

## REFERENCES

1. Longstreth J, De Grujil FR, Kripke ML, et al. Health risks. *J Photochem Photobiol.* 1998;46:20-39.
2. Ringvold A. In vitro evidence for UV-protection of the eye by the corneal epithelium mediated by the cytoplasmic protein, RNA, and ascorbate. *Acta Ophthalmol Scand.* 1997;75:496-498.

3. Ringvold A. In vitro evidence for UV-protection of the eye by the corneal epithelium mediated by the cytoplasmic protein, RNA, and ascorbate. *Acta Ophthalmol Scand.* 1998;76:149-153.
4. Podskochy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82:714-717.
5. Kolozsvari L, Nogradi A, Hopp B, et al. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2165-2168.
6. Bergmanson JG. Corneal damage in photokeratitis: why is it so painful? *Optom Vis Sci.* 1990;67:407-413.
7. Doughty MJ, Cullen AP. Long-term effects of a single dose of ultraviolet-B on albino rabbit cornea-I. in vivo analyses. *Photochem Photobiol.* 1989;49:185-196.
8. Maurice DM. The cornea and sclera. In: Davison H, ed. *The Eye.* Orlando, FL: Academic Press; 1984:1-158.
9. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JI, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3311-3317.
10. 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;35:515-526.
11. Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm.* 2003;250:191-201.
12. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea.* 2003;22:S28-S34.
13. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation.* 2004;77:379-385.
14. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920-926.
15. Garcia M, Escamez MJ, Carretero M, et al. Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering. *Molecular Carcinogenesis.* 2007;46:741-745.
16. Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:2316-2324.
17. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000;6:307-319.
18. Chen J, Li Q, Xu J, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs.* 2005;29:104-113.
19. Hu X, Lui W, Cui L, et al. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Eng.* 2005;11:1710-1717.
20. Han B, Schwab IR, Madsen TK, et al. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea.* 2002;21:505-510.
21. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007;22:631-640.
22. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, et al. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:350-359.
23. Gómez-Sotomayor R, Alaminos M, Pérez MM, et al. Influence of thickness on the transmittance in fibrin-agarose corneal constructs. *Tissue Eng.* 2008;14:869.
24. González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, et al. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3:442-449.
25. Suh MH, Kwon JW, Wee WR, et al. Protective effect of ascorbic acid against corneal damage by ultraviolet B irradiation. A pilot study. *Cornea.* 2008;27:916-922.
26. Cullen AP. Photokeratitis and other phototoxic effects on the cornea and conjunctiva. *Int J Toxicol.* 2002;21:455-464.
27. Pitts DG. A comparative study of the effects of ultraviolet radiation on the eye. *Am J Optom.* 1970;47:535-546.
28. Kinsey VE. Spectral transmission of eye to ultraviolet radiations. *Arch Ophthalmol.* 1948;39:508.
29. Sherashov SG. Spectral sensitivity of the cornea to ultraviolet radiation. *Biofizika.* 1970;15:569.
30. Schive K, Kavli G, Volden G. Light penetration of normal and photokeratitis induced rabbit cornea. *Acta Ophthalmol.* 1984;62:309-314.
31. Oliva MS, Taylor H. Ultraviolet radiation and the eye. *Int Ophthalmol Clin.* 2005;45:1-17.

# Generation of Bioengineered Corneas with Decellularized Xenografts and Human Keratocytes

Miguel Gonzalez-Andrades,<sup>1,2</sup> Juan de la Cruz Cardona,<sup>3</sup> Ana Maria Ionescu,<sup>3</sup> Antonio Campos,<sup>1</sup> Maria del Mar Perez,<sup>3</sup> and Miguel Alaminos<sup>1</sup>

**PURPOSE.** Decellularization of animal corneas is a promising method for the development of artificial human corneas by tissue engineering. In this study, two different decellularization protocols were evaluated to determine which one is able to best preserve the histologic structure, composition, and optical behavior of decellularized porcine corneas. Then, these corneas were recellularized with human keratocytes to obtain a partial human corneal substitute.

**METHODS.** Two different decellularization protocols were applied, using NaCl and SDS, to determine which one is able to best preserve the histologic structure, composition, and optical behavior of the decellularized corneas. Then, those decellularized corneas that showed the most appropriate results were recellularized with human keratocytes and evaluated at the histologic, biochemical, and optical levels for use in regenerative medicine.

**RESULTS.** The results showed that 1.5 M NaCl treatment of porcine corneas is able to generate an acellular corneal stroma with adequate histologic and optical properties and that human keratocytes are able to penetrate and spread within this scaffold with proper levels of cell differentiation. In contrast, 0.1% SDS treatment of porcine corneas resulted in high levels of fibril disorganization and poor optical behavior of these corneas.

**CONCLUSIONS.** In conclusion, the authors suggest that the decellularization of animal corneas with 1.5 M NaCl represents a useful method for the development of human bioengineered corneas with therapeutic potential. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:215–222) DOI:10.1167/iovs.09-4773

The cornea is the most important element in visual function regarding the refractive power of the different elements of the eye.<sup>1</sup> This property is due to the organized, transparent structure of the corneal stroma, which is essential for proper visual function.<sup>2,3</sup> Moreover, the cornea constitutes a tight barrier that protects the internal elements of the eye from the aggression of the external environment.<sup>4</sup>

From the Departments of <sup>1</sup>Histology and <sup>3</sup>Optics, University of Granada, Granada, Spain; and the <sup>2</sup>Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

Supported by the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (FIS PI08/614), and by PI0132/2007 from the Health Department of the Andalusian Regional Government, Spain.

Submitted for publication October 14, 2009; revised February 28 and June 2, 2010; accepted August 3, 2010.

Disclosure: M. González-Andrades, None; J.C. Cardona, None; A.M. Ionescu, None; A. Campos, None; M.M. Pérez, None; M. Alaminos, None

Corresponding author: Miguel Alaminos, Department of Histology, University of Granada, Avenida de Madrid 11, E-18012, Granada, Spain; malaminos@ugr.es.

There are numerous diseases that can affect this highly organized structure, leading to corneal opacification, visual impairment, and even blindness. Moreover, we must take into account that the only treatment at the moment for most of these diseases is corneal transplantation.<sup>5</sup> Nevertheless, there are two major disadvantages related to this procedure: graft rejection and the lack of donors. For that reason, from a clinical point of view it would be very useful to generate a corneal substitute for the human cornea.<sup>6–8</sup>

Nowadays, corneal tissue engineering has emerged as a promising option to solve all these problems. At the time of this writing, several functional artificial corneas based on different types of matrices such as polymers, collagen, or fibrin-agarose scaffolds have been developed.<sup>4,8–10</sup> Although these bioengineered corneal constructs displayed proper levels of biocompatibility, mechanical stability, optical transparency, and refractive power, a promising alternative to these artificial corneas would be the use of corneal xenografts. However, one of the main limits to xenotransplantation in humans is the existence of natural antibodies to the terminal galactose  $\alpha$  1,3 galactose ( $\alpha$ -gal) epitope expressed in the cell membranes of all mammals except those of humans and old world primates; these antibodies can mediate hyperacute or delayed rejection of the xenograft.<sup>11</sup>

In this context, several research groups have chosen the porcine cornea as a suitable xenogeneic corneal matrix substitute to be decellularized, applying different decellularization procedures previously optimized in other tissues different from the cornea.<sup>12</sup> Ideally, a good cornea decellularization protocol should be able to fulfill four major gold-standard criteria: (1) proper decellularization efficiency, with elimination of all cells and cell debris from the decellularized xenograft; (2) proper elimination of all  $\alpha$ -gal epitopes; (3) proper possibility of recellularization of the decellularized tissues using host cells; (4) proper optical behavior of the decellularized corneas. However, all methods described to date for cornea decellularization vary significantly in their efficacy, including the possibility of further recellularization of the acellular matrix.<sup>13–17</sup> In fact, recellularization of decellularized corneas with allogenic human keratocytes had not been achieved at the time of this writing.

In the case of the cornea, all the above-mentioned criteria are essential, since transparency of the cornea is highly dependent on two major parameters: the structure of the stromal matrix<sup>18</sup> and the shape, size, density, and structure of the corneal cells.<sup>19</sup> In fact, Meek et al.<sup>18</sup> considered the cornea to be a structure made only of collagen fibrils and extrafibrillar matrix, and they were able to demonstrate that fibril disordering, increased refractive index mismatch, and increased corneal thickness can account for an increase in light-scattering in human cornea using the direct summation of fields (DSF) method.<sup>20</sup> In contrast, Mourant et al.<sup>19</sup> suggest that the cells themselves would be responsible for the light scattered in small angles, the nuclei would be relevant in the greater angles,

and small organelles such as mitochondria and lysosomes, would be responsible for the light scattered in large angles. Both the extracellular matrix and the corneal cells play a key role in the spectral transmittance function of the human cornea, which seems to be dominated by light-scattering processes rather than by absorption, with the latter being relevant only in the extreme short wavelength.<sup>21</sup>

In the present study, we optimized and evaluated two different decellularization methods, using NaCl and SDS to determine which one is able to best preserve the histologic structure, composition, and optical behavior of the decellularized corneas. Then, those decellularized corneas that showed the most appropriate results were recellularized with human keratocytes and evaluated at the histologic, biochemical, and optical levels for use in regenerative medicine.

## MATERIAL AND METHODS

### Decellularization of Porcine Corneas

Ninety fresh porcine corneas were obtained from adult pigs immediately after their death at a local slaughterhouse. The eyes selected for the study had integral corneal surface with a horizontal corneal diameter of 12 to 14 mm. The native porcine cornea (NPC) with 2-mm scleral ring was removed with a 16-mm corneal trephine. Ten NPCs were used as controls. The corneal epithelium and endothelium were removed, using 4 mg/mL Dispase II for 45 minutes at 37°C. All the solutions in which porcine corneas were immersed had a mass ratio of 20:1 (solution:cornea). Corneas were washed thoroughly with 10% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 minutes and then washed in PBS. Two independent decellularization processes were performed: one using 1.5 M NaCl (applied to 50 corneas) and the other using 0.1% SDS in PBS (applied to 30 corneas). Both protocols were carried out with continuous shaking (200 rpm) for 12 hours at room temperature. Then, acellular porcine corneas (APCs) were washed three times with PBS for 30 minutes at room temperature with continuous shaking (200 rpm). Once decellularized and to eliminate the liquid excess, the APCs were kept in a specific chamber for 30 minutes. This chamber consisted of a 5-cm diameter stage where the APCs were introduced between several layers of paper towels (3MM; Whatman, Qiagen, Valencia, CA).

### Obtaining Human Keratocytes

Corneal-scleral limbal rims of 14-mm diameter were obtained at the University Hospital of San Cecilio (Granada, Spain), after the removal of  $\pm 7$ -mm central corneal buttons for corneal transplantation. Stromal keratocytes were isolated from fragments of corneal stroma that remained attached to the sclerocorneal limbus, by using collagenase I (Invitrogen-Gibco) at 37°C for 6 hours. The culture medium used was DMEM supplemented (DMEMs) with 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen-Gibco). All cells were incubated at 37°C in 5% carbon dioxide under standard culture conditions.

All experimental protocols, including the use of both human and animal tissues, were approved by the Institutional Review Board and Institutional Animal Care and Use Committee of Granada University Hospital San Cecilio. This work adhered to the Declaration of Helsinki and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. For the use of human corneal rims after trephination of the donor buttons for research purposes, a written approval was obtained from the legal representatives of the donors according to the protocols established by the Spanish National Organization for Human Transplantation (ONT).

### Recellularization of APCs

After washing the APCs with PBS, we immersed 20 of them treated with NaCl in DMEMs (20:1 mass ratio) for 3 hours. Then, the culture

medium was removed, and 200,000 human keratocytes were seeded on the corneal surface at room temperature. After 2 hours, the corneas were completely submerged in DMEMs to a mass ratio of 20:1. All recellularized corneas (RCs) were incubated at 37°C in 5% carbon dioxide under standard culture conditions for 14 days. This recellularization process was applied only to APCs decellularized with the protocol that most efficiently preserved the original structure of the native cornea (i.e., corneas decellularized with NaCl).

### Histology and Fluorescence Immunohistochemistry Evaluation

For light microscopy, native and bioengineered corneas were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated in an ethanol series, and embedded in paraffin. Cross sections were cut, 4  $\mu$ m thick, stained with hematoxylin and eosin or Alcian blue, and examined with a light microscope.

The expression of  $\alpha$ -gal epitope and aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) was determined by fluorescence immunohistochemistry, using paraffin-embedded tissue sections corresponding to NPCs, APCs, and RCs.

First, paraffin was removed from the tissue sections, using xylene, and the samples were rehydrated in water through a graded series of alcohols (100%, 96%, 70%, 50%, and water). Then we used a 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) at 95°C for 10 minutes for antigen retrieval. After blocking any unspecific binding sites using bovine serum albumin, we incubated the samples with the primary antibodies for 1 hour at room temperature. Mouse monoclonal antibodies against the  $\alpha$ -gal epitope (ALX-801-090-L002, clone M86; Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) were applied 1:20. Goat polyclonal antibody against ALDH1 (PC713, purified goat polyclonal antibody; Calbiochem, Darmstadt, Germany) was used 1:300. Incubation with secondary antibodies was carried out for 30 minutes using FITC-conjugated anti-mouse antibody (F9137, dilution 1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or CY3-conjugated anti-goat antibody (C-2821, dilution 1:500; Sigma-Aldrich). Finally, the slides were counterstained with DAPI and photographed by light microscope (Eclipse i90; Nikon, Tokyo, Japan).

To determine the efficiency of both the decellularization and the recellularization methods, histologic images corresponding to each tissue type were obtained. Then, the number of remaining nuclear debris (60 decellularized corneas: 30 treated with NaCl and 30 treated with SDS) and the number of keratocytes (20 recellularized corneas) were determined per each field, by using imaging software (NIS-Elements; Nikon) in the automatic detection mode, taking into account that 12 microscopic fields per sample were used for the statistical analysis. All values obtained in this work corresponded to corneal stroma fields of 2700  $\mu$ m<sup>2</sup>.

### Fiber Orientation Analysis and Surface Characterization

Surface characterization and analysis of stromal fiber orientation of the samples dyed with hematoxylin and eosin was performed with Surf-Char[ ImageJ plug-in for surface assessment (ImageJ software, developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).<sup>22</sup> This plug-in allows for the calculation of structure orientation based on the mean resultant vector<sup>23</sup> and plots the frequency of azimuthal angles for estimating the preferred orientation. To analyze the fiber orientation of the whole APC, we first obtained individual hematoxylin and eosin staining pictures of the anterior and the posterior half of the APC. Then, the analysis was carried out individually for each picture, and average values were calculated.

### Evaluation of the Optical Proprieties of the Corneas

Spectral distribution of the reflectance of the decellularized and recellularized corneas was determined by using a spectroradiometer (SpectraScan PR-704; Photo Research, Inc., Chatsworth, CA) with 4% mea-

surement accuracy. The percentage of repeatability of the measurements was much lower (the SD of repeat measurements over a 15-minute period was  $<0.1\%$ ). The specimens were situated in a cabinet (CAC 60; Verivide Ltd., Leicester, UK) and a source simulating the spectral relative irradiance of CIE (The International Commission on Illumination) standard illuminant D65 was used. Illuminating and viewing configurations were CIE  $d/0^\circ$  geometry. For the measurements the specimens were situated over a black-and-white background.

The measurements were made in the center of the samples. Non-significant differences were found between the spectral reflectance values of each place ( $P > 0.05$ ). Before each measurement, the sample thickness was determined with an optical microscope (CO11; Olympus, Lake Success, NY).

The scattering coefficient ( $S$ ) was calculated algebraically from the spectral reflectance data of each tissue using Kubelka-Munk (K-M) equations.<sup>24,25</sup> This phenomenologic scattering coefficient is a pure function of the physical scattering coefficient of the medium to be studied.<sup>26</sup>

Using the secondary optical constants ( $a$  and  $b$ ) and the scattering coefficient ( $S$ ) we calculated the transmittance as  $T(X) = b/[a \cdot \sinh(bSX) + b \cdot \cosh(bSX)]$ .

### Statistical Analysis

Statistical comparison of the average number of remaining nuclear debris between NaCl- and SDS-treated APCs and fiber orientation parameters of NPCs, APCs, and RCs was carried out by using the non-parametric Mann-Whitney U test. Absolute average values for the scattering and absorbance curves were compared by using the same statistical test, whereas the trend, as determined by the shape of the curve, was compared using the VAF (value adjustment factor) test.

All tests were performed two-tailed and a Bonferroni-adjusted  $P < 0.0025$  was considered as statistically significant, since up to 20 statistical tests were performed ( $0.05/20 = 0.0025$ ).

## RESULTS

### Evaluation of APCs Decellularized with SDS- and NaCl-Based Protocols

As shown in Figure 1, the macroscopical transparency level of corneas decellularized with NaCl was similar to that of the control NPC. However, SDS-treated corneas apparently showed lower transparency than the other types of corneas.

Histologic analysis, using DAPI and hematoxylin and eosin staining of APCs subjected to NaCl or SDS decellularization protocols, revealed that both methods were able to eliminate all cells previously present in the corneas, although some nuclear debris remained in both cases (Fig. 2); however, the efficiency of both decellularization methods was different and APCs treated with SDS showed a lower level of remaining nuclear debris than APCs treated with NaCl (average,  $1.6 \pm 1.8$  for SDS and  $4.5 \pm 2.0$  for NaCl). Differences were statistically significant ( $P < 0.001$ ). In addition, the stroma in the APCs treated with SDS was partially disorganized in comparison to

that in the NaCl-treated APCs and NPCs. Both decellularization protocols maintained the presence and the integrity of Bowman's layer and Descemet's membrane, as determined by hematoxylin and eosin (Fig. 2).

On the other hand, fiber orientation analysis using the SurfCharJ ImageJ plug-in (Fig. 2) demonstrated that APCs subjected to the NaCl decellularization protocols showed a fiber distribution that was very similar to the control NPCs, whereas SDS-treated APCs displayed a high level of fiber disorganization. In fact, the direction of the fibers of SDS-treated APCs, as determined by DAF (direction of azimuthal facets) was significantly different from that of the control NPCs ( $P = 0.001$ ), with polar plot images showing high fiber disorientation in the anterior part of the cornea. In contrast, DAF and polar plot images of NaCl-treated APCs were comparable to those of the control NPCs ( $P > 0.05$ ). In the same sense, polar facet orientation (both the mean PFO and variation MFOV) and surface area (SA) showed that the organization and orientation of the fibers were more similar to those of the controls for NaCl-treated APCs than for SDS-treated APCs, with differences being statistically significant only for SDS-treated APCs ( $P = 0.001$  for PFO and DAF and  $P < 0.001$  for SA for the comparison of NPCs and SDS-treated APCs).

Moreover, as shown in Figure 2, Alcian blue staining showed that proteoglycans were distributed throughout the NPCs, with an increase in concentration in the most anterior part of the stroma. APCs treated with NaCl presented Alcian blue dye intensity levels that were comparable to those of NPCs, except for the most anterior corneal stroma, in which stain intensity was lower than that of the NPCs. In the third place, APC treated with SDS changed this pattern, showing lower dye intensity in all the stroma in comparison to NPCs and APCs treated with NaCl. Hence, the most anterior stroma decellularized with SDS did not display any proteoglycan expression level at all.

The immunofluorescence analysis of  $\alpha$ -gal protein expression showed regular distribution of  $\alpha$ -gal epitope across all the thicknesses of the stroma of the NPCs (Fig. 2). Regarding the APCs, corneas treated with both kinds of decellularization protocols did not display any significant expression of  $\alpha$ -gal epitope.

Finally, evaluation of the optical properties of the APCs showed that the spectral distribution of the transmittance and the K-M scattering coefficient of APCs treated with NaCl and SDS were very similar to those of the control NPCs, as determined by VAF analysis (VAF  $> 95.49\%$  in Table 1, Fig. 3). In fact, the K-M scattering coefficient decreased with increasing wavelength, and this decrease was more pronounced for the short and medium wavelengths. In terms of transmittance, the spectral distribution of both types of APCs approximated well that of the control NPCs, although statistically significant differences were found for all samples analyzed ( $P < 0.001$ , Table 1).

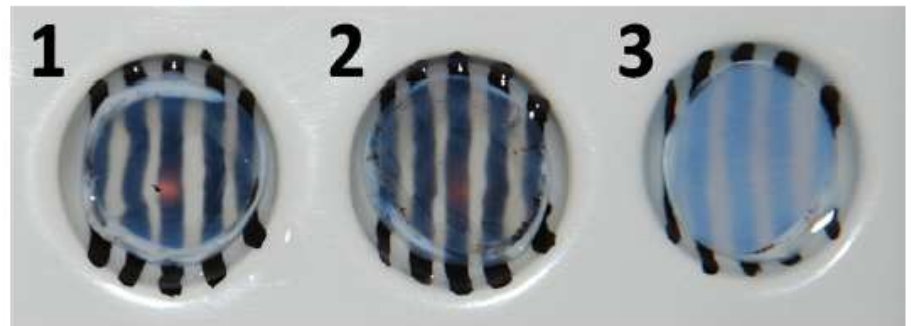


FIGURE 1. Macroscopical appearance of NPC (1) and corneas decellularized with 1.5M NaCl (2) and 0.1% SDS (3). All corneas were set on a black-and-white striped background to show transparency.

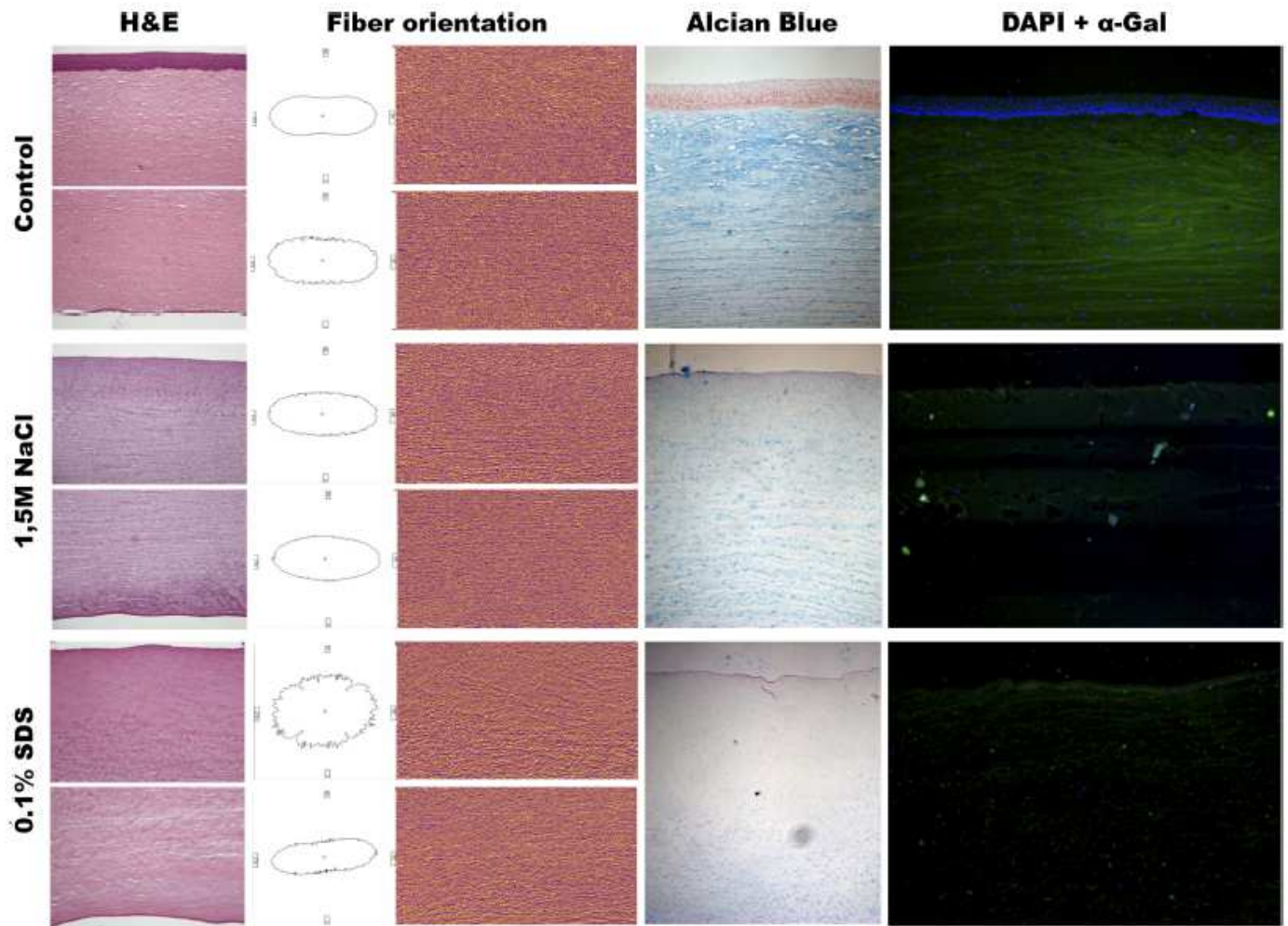


FIGURE 2. Analysis of NPC (top row) and corneas decellularized with 1.5 M NaCl (middle row) and 0.1% SDS (bottom row). First column: hematoxylin and eosin staining of the anterior and posterior regions of the corneas; second column: fiber orientation analysis with polar plot images; third column: azimuthal images; fourth column: Alcian blue staining of the different samples; fifth column: fluorescence immunohistochemistry against  $\alpha$ -gal epitope

### Recellularization Efficiency

Hematoxylin and eosin staining of APCs recellularized with human keratocytes demonstrated that human cells were able to migrate and spread into the acellular corneal stroma decellularized with NaCl (Fig. 4). These results were confirmed by DAPI fluorescence staining. Furthermore, our histologic analysis revealed that the number of cells in the recellularized APCs

was comparable to that of the control NPCs (average,  $11.9 \pm 5.3$  cells per field for recellularized APCs vs.  $9.5 \pm 2.1$  cells per field for NPCs;  $P > 0.05$ ), although the distribution of the cells could be more irregular in recellularized APCs in comparison with the control NPCs (Fig. 4).

Moreover, keratocytes expressed high levels of ALDH1 protein (a marker of mature keratocytes) after 3 weeks in

TABLE 1. Statistical Comparison of the Spectral Distributions of the Transmittance and the Kubelka-Munk (K-M) Scattering Coefficient of Control NPC, NaCl-Treated APC (NaCl APC), SDS-Treated APC (SDS APC) and RC

	NPC	SDS APC	NaCl APC	RC
Scattering				
NPC	—	VAF = 95.49%	VAF = 98.93%	VAF = 99.80% $P < 0.001$
SDS APC	$P < 0.001$	—	VAF = 97.98%	
NaCl APC	$P < 0.001$	$P < 0.001$	—	
Transmittance				
NPC	—	VAF = 85.39%	VAF = 94.45%	VAF = 99.48% $P < 0.001$
SDS APC	$P < 0.001$	—	VAF = 96.78%	
NaCl APC	$P < 0.001$	$P < 0.001$	—	

$P$ -values correspond to the Mann-Whitney U statistical comparison, whereas VAF correspond to the similarity of the curves as determined by the value adjustment factor test.

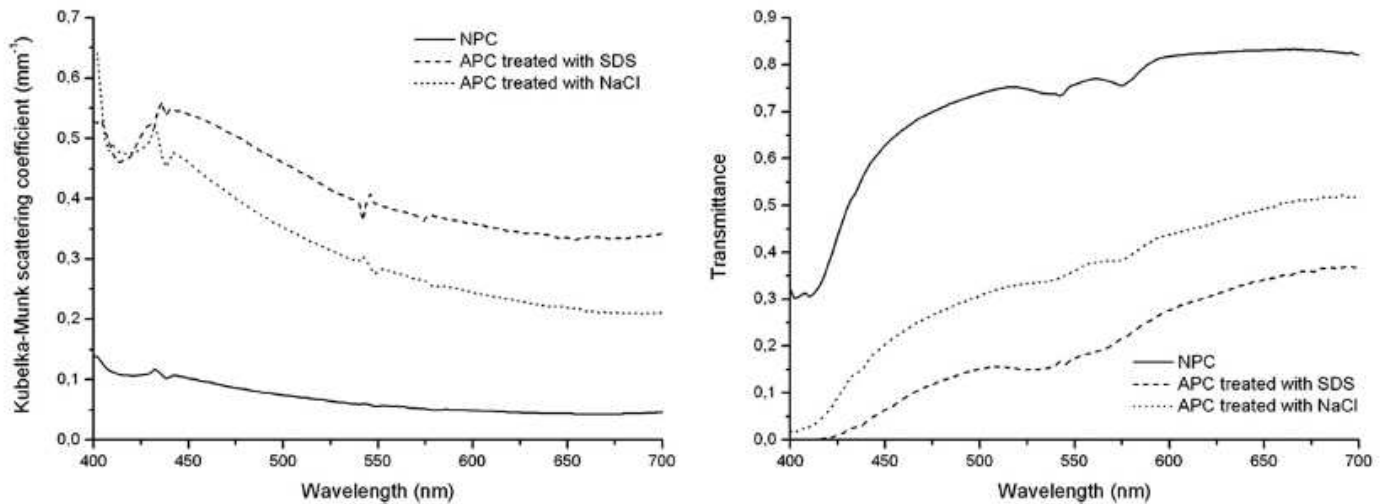


FIGURE 3. Spectral distribution of the Kubelka-Munk scattering coefficient and transmittance of the control NPCs and the APCs treated with NaCl and SDS.

culture, as demonstrated by fluorescence immunohistochemistry (Fig. 5).

On the other hand, our optical analysis revealed that the spectral behavior of the scattering coefficient and transmittance of RCs was very similar to those of the control NPCs (VAF > 99.32%; Table 1). In addition, we found that the transmittance increased when corneas were recellularized, suggesting that human keratocytes may play a key role in maintaining corneal transparency. As shown in Figure 6, both the K-M scattering coefficient and the transmittance values of RCs tended to mimic those of the control corneas after 2 weeks in culture. In the same sense, both the NPCs and RCs had a spectral dependency that was proportional to the inverse of the cube of the wavelength. Statistically, we obtained significant differences for all comparisons performed ( $P < 0.001$ , Table 1).

**DISCUSSION**

Generation of artificial corneas based on decellularization methods should fulfill requirements similar to those of native human corneas, including biocompatibility, immunologic acceptance, mechanical integrity, and optical transparency.<sup>8,13</sup>

These decellularized corneas should also provide the specific microenvironment for the stromal and epithelial cells to migrate and repopulate the tissue graft, both in vitro and in vivo.

Most of these requirements depend on the perfectly organized structure of the corneal stroma, which is very difficult to mimic in the laboratory. Moreover, human and porcine corneas have a great amount of similarities regarding their physical and chemical properties, as previously described.<sup>14,27</sup> In fact, porcine corneas are commonly used as an animal model due to their availability from meat-packing houses and their relative similarity to human corneas.<sup>28</sup> Various physical properties of porcine corneas have been investigated and compared with corneas of pigs, mice, rabbits, sheep, cats, dogs, and cows. These studies found that water, hydroxyproline and chondroitin-sulfate contents were approximately constant across the species, except for mice, and that keratin-sulfate content increased with corneal thickness, whereas dermatan-sulfate content decreased.<sup>14</sup> Therefore, decellularization scaffolds emerge as promising tools in tissue engineering due to their similarity to native tissues and their availability.<sup>28</sup>

However, one of the major problems for xenotransplantation in humans is the presence of natural human antibodies against  $\alpha$ -gal epitope, which induces mild cellular rejection.<sup>11</sup>

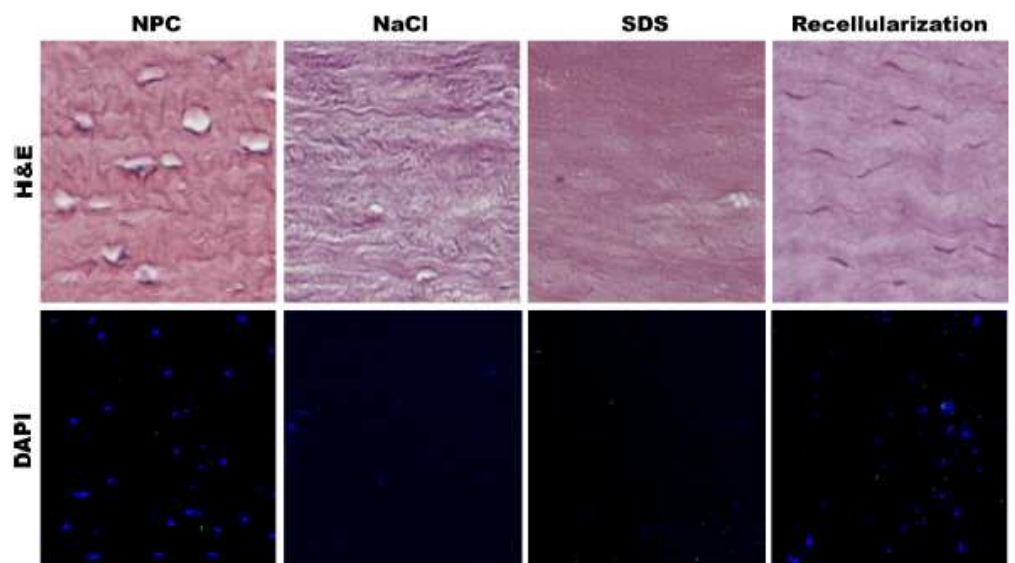


FIGURE 4. Histologic analysis of NPCs: corneas decellularized with 1.5 M NaCl and 0.1% SDS, and recellularized corneas stained with hematoxylin and eosin (top row) and DAPI (bottom row).

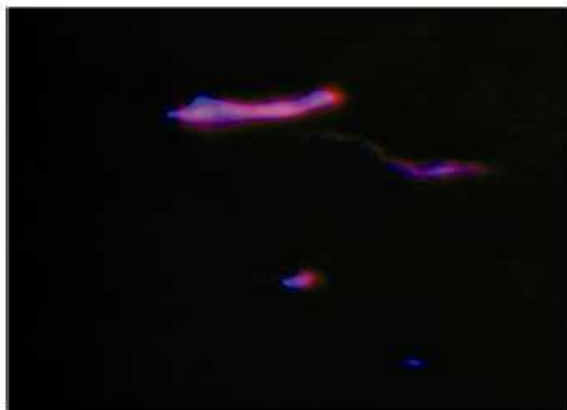


FIGURE 5. Fluorescence immunohistochemistry against ALDH1 protein showing a positive signal (pink) in the recellularized human keratocytes (blue nucleus with DAPI).

The decellularization process carried out in this study eliminated most of the  $\alpha$ -gal epitope signal, as shown by immunofluorescence. Hence, our decellularized corneas may be immunologically accepted by a human host once implanted in vivo.

Several decellularization protocols have been described to date. However, none of them appeared to be the ideal method for application in human corneal regeneration. Some research groups have described several corneal decellularization methods using physical and chemical protocols to remove cells from the corneal xenograft.<sup>13-17,29,30</sup> Even when successful results have been described by these groups, there are some disadvantages involved in the majority of the protocols used.<sup>12</sup> In most cases, the highly organized structure of the collagen stroma fibers becomes impaired after the decellularization process, with partial elimination of some key extracellular matrix components such as proteoglycans.

In this context, NaCl and SDS have been proposed as highly efficient decellularization methods. Several research groups have previously applied NaCl along with other chemical elements to remove cells from tissues like mesangial glomerulus and dermis.<sup>31,32</sup> Recently, Oh et al.,<sup>13</sup> described the use of NaCl to decellularize anterior sliced animal stromas of 250  $\mu$ m thickness. In the present study, we described two different methods based on the use of NaCl and SDS to generate a full-thickness acellular corneal stroma. Our results suggest that

NaCl treatment of porcine corneas generates better results, with a fiber distribution that was very similar to that of the control NPCs, as demonstrated by histologic and surface orientation analysis. Although the protocol based on SDS treatment resulted in proper decellularization levels, the disorganization of the collagen fibers and the excessive degree of proteoglycan removal hampers the use of this type of protocol. In contrast, the use of NaCl on full-thickness corneas was able to efficiently decellularize these organs without affecting the fibril orientation or the proteoglycan composition of the decellularized cornea.

Moreover, optical analysis confirmed that the use of NaCl did not significantly disrupt the fibril orientation compared with SDS treatment, since optical scattering of NaCl-treated corneas was lower than that of SDS-treated corneas. In concordance with that, the highest transmittance levels were found for corneas treated with protocols based on NaCl, although these levels were lower than those of the NPC due to the higher scattering that was found in decellularized corneas. This high scattering may be associated with a partial disorganization of the extracellular matrix fibrils, the loss of cells within the stroma, and the change of the refractive index, because the areas that were previously populated by stromal keratocytes are now occupied by a fluid in the decellularized corneas. These factors strongly influence the increase in scattering.<sup>18</sup>

There are several hypotheses that have been advanced relating cornea structure and transparency. Features of the ultrastructure of the cornea, such as fibril length, most probable orientation of the fibrils, and angle between optic and geometric axis of the fibrils, can be described applying a nonrandom assembly of anisotropic fibril model to the light-scattering patterns of human cornea.<sup>33</sup> McCally and Farrell<sup>34</sup> investigated the wavelength dependency of scattering within the cornea and concluded that the range of the ordering of the collagen fibrils (e.g., short-distance versus long-distance order) would affect scattering. Therefore, estimation of the scattered light is essential to evaluate the orientation of the corneal fibrils, as with the corneal transparency. In our study, just like the results obtained by McCally and Farrell,<sup>34</sup> we found that the recellularized corneas treated with NaCl also adjusted to the spectral dependency of the scattering, proportional to the inverse of the cube of wavelength. This cubic wavelength dependency of the scattering in our corneas is in contrast with the Rayleigh four-power dependency, which assumes no regularity of the

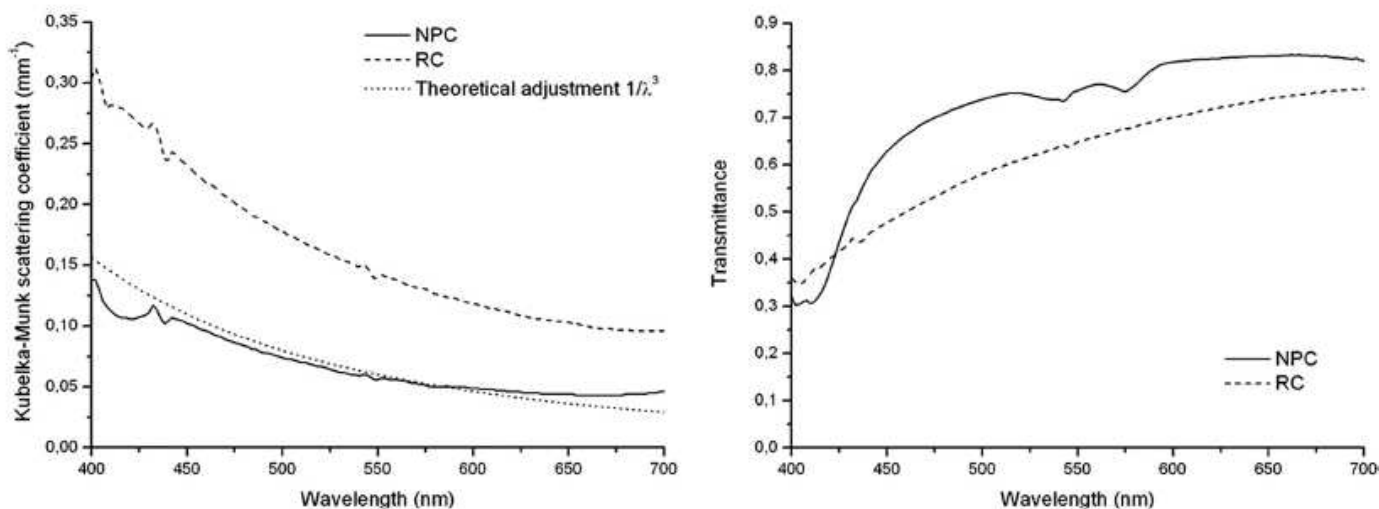


FIGURE 6. Spectral distribution of the Kubelka-Munk scattering coefficient and transmittance of the control NPCs and RCs. The theoretical adjustment demonstrating that both NPCs and RCs had a spectral dependency that was proportional to the inverse of the cube of the wavelength is shown.

scattering particles and that these particles have negligible dimensions compared with the wavelength.<sup>34</sup>

To determine the optical properties of the corneas, we used a simple, noninvasive method that has been widely used to evaluate the optical properties of different tissues.<sup>35,36</sup> By applying this method, we demonstrated that the NaCl-treated APCs showed a fiber distribution that was very similar to that of the control corneas, whereas SDS-treated APCs displayed a high level of fiber disorganization. This finding is supported by the results for the optical properties of the NaCl-treated APCs, where scattering and transmittance values were comparable to those of the control cornea.

Recellularization of acellular corneal stromas is one of the most important steps to develop a human corneal substitute in the laboratory. Although the need for repopulation of decellularized scaffolds is controversially discussed,<sup>37</sup> in this work we wanted to evaluate the capability of our corneal model to be repopulated by well-differentiated human keratocytes for tissue engineering purposes and to determine the optical properties of the recellularized corneas. In this context, we have described the first partial human cornea substitute that is based on decellularized porcine corneas further recellularized with human keratocytes. The method described here is able not only to maintain the structure of the native cornea, but also to offer a proper microenvironment for keratocytes to penetrate and proliferate within the stroma. Although the distribution of the cells in the native cornea could be more uniform, keratocytes were able to properly spread into the decellularized scaffold, reaching a number of cells that was very similar to that of the control corneas. In addition, the characteristic expression of ALDH1 by human keratocytes was not affected, suggesting that APCs were repopulated by mature stromal cells. ALDH1 is a distinctive marker of keratocytes that has been used in another study to distinguish differentiated keratocytes from myofibroblasts, which do not express ALDH1.<sup>38</sup> Moreover, this enzyme seems to act as an essential element for keeping the transparency of the cornea.<sup>39</sup> In the embryo, development of corneal transparency is associated with decreased light-scattering from postnatal keratocytes together with a marked increase of ALDH1 expression levels,<sup>40</sup> which is similar to our findings.

Our results suggest that 1.5 M NaCl treatment of porcine corneas generates an acellular corneal stroma with adequate histologic and optical properties, offering a proper microenvironment for human keratocytes to penetrate and keep their differentiation within the stroma. These substitutes recellularized with human keratocytes could have therapeutic potential. APCs with various thicknesses could be generated to repair specific defects of the corneal stroma and could eventually be used as a treatment for different kinds of corneal diseases.

## References

1. Ayres BD, Rapuano CJ. Refractive power of the cornea. *Compr Ophthalmol Update*. 2006;7:243-251; discussion 253-255.
2. Li F, Carlsson D, Lohmann C, et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15346-15351.
3. Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering: gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27:549-577.
4. Gonzalez-Andrades M, Garzon I, Gascon MI, et al. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:442-449.
5. Kruse FE, Cursiefen C. Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation. *Dev Ophthalmol*. 2008;41:159-170.
6. McCogan K. Corneal transplant surgery. *J Perioper Pract*. 2009;19:51-54.
7. Melles GR, Remeijer L, Geerards AJ, Beekhuis WH. The future of lamellar keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*. 1999;10:253-259.
8. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea*. 2003;22:S28-S34.
9. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:3311-3317.
10. Rafat M, Li F, Fagerholm P, et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29:3960-3972.
11. Badyal SF. Xenogenic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 2004;12:367-377.
12. Gilbert TW, Sellaro TL, Badyal SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27:3675-3683.
13. Oh JY, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. Processing porcine cornea for biomedical applications. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15:635-645.
14. Xu YG, Xu YS, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis*. 2008;14:2180-2189.
15. 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;329:249-257.
16. Lin XC, Hui YN, Wang YS, Meng H, Zhang YJ, Jin Y. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit. *Vet Ophthalmol*. 2008;11:61-66.
17. Wu Z, Zhou Y, Li N, et al. The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials*. 2009;30:3513-3522.
18. Meek KM, Leonard DW, Connon CJ, Dennis S, Khan S. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye*. 2003;17:927-936.
19. Mourant JR, Canpolat M, Brocker C, et al. Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *J Biomed Opt*. 2000;5:131-137.
20. Freund DE, McCally RL, Farrell RA. Direct summation of fields for light scattering by fibrils with applications to normal corneas. *Appl Opt*. 1986;25:2739.
21. van den Berg TJ, Tan KE. Light transmittance of the human cornea from 320 to 700 nm for different ages. *Vision Res*. 1994;34:1453-1456.
22. Chinga G, Johnsen PO, Dougherty R, Berli EL, Walter J. Quantification of the 3D microstructure of SC surfaces. *J Microsc*. 2007;227:254-265.
23. Curray J. The analysis of two-dimensional orientation data. *J Geol*. 1956;64:117-131.
24. Ragain JC Jr, Johnston WM. Accuracy of Kubelka-Munk reflectance theory applied to human dentin and enamel. *J Dent Res*. 2001;80:449-452.
25. Lee YK. Influence of scattering/absorption characteristics on the color of resin composites. *Dent Mater*. 2007;23:124-131.
26. Thennadil SN. Relationship between the Kubelka-Munk scattering and radiative transfer coefficients. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2008;25:1480-1485.
27. Lee H, Kim M, Ko J, Lee H, Lee J, Wee W. The characteristics of porcine cornea as a xenograft. *J Korean Ophthalmol Soc*. 2006;47:2020-2029.
28. Kampmeier J, Radt B, Birngruber R, Brinkmann R. Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea. *Cornea*. 2000;19:355-363.
29. Zhang C, Jin Y, Nie X, Liu Y, Lei J, Hu D. A comparative study on biocompatibility of acellular corneal stroma materials prepared by serial digestion methods (in Chinese). *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2006;20:185-188.
30. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N<sub>2</sub> gas. *Mol Vis*. 2008;14:878-882.
31. Makino H, Ota Z. Three-dimensional architecture of the mesangial matrix—comparison of the intact and acellular glomerulus. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1989;31:1039-1045.
32. Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, Walter JM, Hanumadass M. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns*. 1998;24:104-113.



33. Bettelheim FA, Kumbar M. An interpretation of small-angle light-scattering patterns of human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16:233-236.
34. McCally RL, Farrell RA. *Interaction of Light and the Cornea: Absorption Versus Wavelength.* New York: Raven Press; 1988:6.
35. Hoffmann J, Lübbers DW, Heise HM. Applicability of the Kubelka-Munk theory for the evaluation of reflectance spectra demonstrated for haemoglobin-free perfused heart tissue. *Phys Med Biol.* 1998;43:3571-3587.
36. Egger HR, Blazek V. Optical properties of human brain tissue, meninges, and brain tumors in the spectral range of 200 to 900nm. *Neurosurgery.* 1987;21:459-464.
37. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation.* 2006;114:1559-565.
38. He J, Bazan HE. Epidermal growth factor synergism with TGF-beta1 via PI-3 kinase activity in corneal keratocyte differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2936-2945.
39. King G, Holmes R. Human ocular aldehyde dehydrogenase isozymes: distribution and properties as major soluble proteins in cornea and lens. *J Exp Zool.* 1998;282:12-17.
40. Jester JV, Lee YG, Huang J, et al. Postnatal corneal transparency, keratocyte cell cycle exit and expression of ALDH1A1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4061-4069.

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA  
INDEPENDIENTE**

Expediente nº

TITULO: ESTUDIO MULTICÉNTRICO, ABIERTO PARA LA EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y FACTIBILIDAD DE UN MEDICAMENTO DE INGENIERÍA TISULAR AUTÓLOGO (CÓRNEA ARTIFICIAL HUMANA NANOESTRUCTURADA LAMELAR ANTERIOR CON QUERATOCITOS AUTÓLOGOS CULTIVADOS EN SU INTERIOR Y EPITELIO CORNEAL AUTÓLOGO CULTIVADO EN SU SUPERFICIE) EN PACIENTES CON ÚLCERAS CORNEALES PROFUNDAS DE TIPO TRÓFICO Y EVOLUCIÓN TÓRPIDA			
Solicitante: Fundación Progreso y Salud			
TIPO DE PROYECTO:	INDIVIDUAL	MULTICENTRICO	X
<b>RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): (Máximo 250 palabras)</b> <b>OBJETIVO GENERAL:</b> Evaluar la seguridad, factibilidad e indicios de eficacia clínica de un modelo de córnea artificial humana nanoestructurada lamelar anterior, en un grupo de pacientes afectos de patología corneal grave, para los cuales no existe actualmente una alternativa terapéutica eficaz. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> 1.- Generar córneas artificiales humanas nanoestructuradas lamelares de origen autólogo a partir de biopsias del limbo esclero-corneal de un grupo de pacientes y biomateriales de fibrina y agarosa. 2.- Implantar las córneas artificiales humanas nanoestructuradas de origen autólogo en un grupo de pacientes afectos de patología corneal grave mediante queratoplastia lamelar anterior parcial. 3.- Evaluar la bioseguridad de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas de origen autólogo implantadas en los pacientes para descartar efectos secundarios de relevancia. <b>DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO:</b> Estudio experimental, prospectivo, abierto y multicéntrico. Debido a las características del medicamento a evaluar no es posible establecer un estudio ciego. Este estudio consiste en una fase piloto e inicial en la que se incluirán de 5 a 10 pacientes. Posteriormente se prevé realizar, en base a los datos obtenidos en esta fase, un ensayo clínico fase I/II en la que habrá un grupo experimental de pacientes y un grupo control. La población de estudio está constituida por pacientes afectos de úlceras corneales profundas de tipo trófico y de evolución tórpida que acuden a los Servicios de Oftalmología implicados en este proyecto de investigación.			
<b>TITLE: MULTICENTRIC STUDY, OPEN FOR EVALUATION OF BIOSAFETY AND FEASIBILITY OF AN AUTOLOGOUS TISSUE ENGINEERING MEDICAMENT (ARTIFICIAL HUMAN ANTERIOR LAMELLAR CORNEA GENERATED BY NANOSTRUCTURATION WITH AUTOLOGOUS KERATOCYTES WITHIN AND AUTOLOGOUS CORNEAL EPITHELIUM ON TOP) IN PATIENTS WITH DEEP CORNEAL ULCERS OF TROPHIC NATURE AND TORPID EVOLUTION</b>			
<b>SUMMARY (Objectives and methodology):</b> <b>MAIN OBJECTIVE:</b> The major purpose of this project is to evaluate safety, feasibility and preliminary signs of clinical efficacy of a novel model of artificial human anterior lamellar cornea generated by nanostructuring in a group of patients with severe corneal diseases for which a good therapeutical approach is not available to date. <b>SPECIFIC OBJECTIVES:</b> 1.- To generate human artificial nanostructured corneas of autologous origin from tissue biopsies of the corneal limbus of a group of patients and fibrin-agarose biomaterials. 2.- To implant the autologous human artificial nanostructured corneas in a group of patients with severe corneal disease by partial anterior lamellar keratoplasty. 3.- To evaluate the level of biosafety of the implanted autologous human artificial nanostructured corneas to detect any significant adverse effects. <b>DESIGN AND POPULATION STUDIED:</b> The present study is experimental, prospective, open and multicentric. Due to the nature of the medicament product that will be evaluated, it is not possible to establish a blind design. This project consists in an initial pilot phase that will include 5 – 10 patients. On the basis of the information obtained in this phase, a phase I/II clinical trial with an experimental group and a control group will be designed.			

The population included in the study consists of patients with deep corneal ulcers of trophic nature and torpid evolution that are received by the different Divisions of Ophthalmology that participate in this research project.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Título y resumen

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

Solicitante: Fundación Progreso y Salud

### Antecedentes y estado actual del tema (citar las referencias incluidas en el apartado siguiente).

La **córnea** es una estructura transparente y carente de vasos, a través de la cual la luz penetra en el ojo. Debido a su función de barrera, la integridad y el correcto funcionamiento de la córnea son imprescindibles para una correcta función visual (Meek y Boote, 2004). Histológicamente, la córnea se compone de cinco capas que, de anterior a posterior, se denominan: **epitelio anterior**, lámina limitante anterior o **membrana de Bowman**, sustancia propia o **estroma corneal**, lámina limitante posterior o **membrana de Descemet** y epitelio posterior o **endotelio corneal**. La primera de las capas, el epitelio anterior, está constituido por 5-10 estratos de **células epiteliales** muy bien cohesionadas entre sí mediante diversos **complejos de unión**, incluyendo desmosomas, uniones comunicantes (gap) y uniones estrechas. La renovación de estas células es constante, pues las células epiteliales están continuamente descamándose hacia el exterior de la córnea, siendo sustituidas por células procedentes de las capas más basales del epitelio corneal. A su vez, las células de las capas basales se renuevan y regeneran constantemente a partir de **células madre** corneales localizadas a nivel de la transición entre la córnea y la esclerótica (**limbo esclero-corneal**). Por otro lado, el estroma corneal constituye el 90% del espesor total de la córnea, estando constituido por una abundante **matriz extracelular** muy rica en fibras de colágeno tipo I y glicosaminoglicanos, en el espesor de la cual se sitúan las células del estroma, denominadas **queratocitos** o **células estromales corneales**. La disposición tridimensional de las fibras de colágeno, junto con la deshidratación relativa que existe en el estroma, son fundamentales para el mantenimiento de la transparencia corneal. Finalmente, el endotelio corneal está formado por una única capa de células planas, hexagonales, cuya función de **transporte iónico** es fundamental para el control del nivel de hidratación del estroma corneal y, por tanto, de la transparencia de la córnea.

La **patología** congénita o adquirida de la córnea constituye uno de los problemas más frecuentes en oftalmología, siendo numerosas las causas que provocan una alteración grave de la fisiología y la estructura corneal. En estos casos, suele ser necesario recurrir a tratamientos agresivos y no exentos de complicaciones, como son los implantes de membrana amniótica, los diferentes tipos de queratoprótesis e incluso el trasplante alogénico de córnea (**queratoplastia penetrante**), considerado el trasplante que más se realiza todos los años en el mundo (Dua y Azuara-Blanco, 1999), con más de un millón de casos trasplantados desde los años 60. Sin embargo, el trasplante corneal es una técnica altamente dependiente de la disponibilidad de córneas procedentes de donantes cadáveres, lo cual hace que un gran número de personas permanezcan en **lista de espera para trasplante** durante periodos de tiempo muy elevados, con la morbilidad que ello conlleva. Por otro lado, es bien sabido que el trasplante de órganos procedentes de donante está sujeto a la posibilidad de **rechazo inmunológico** cuando estos órganos son implantados, obligando al paciente a someterse a terapia inmunosupresora durante toda su vida. Finalmente, el trasplante de cualquier tipo de órgano o tejido, incluida la córnea, es una técnica sujeta a la posibilidad de transmisión de todo tipo de **enfermedades infecciosas** desde el donante hasta el receptor, incluyendo VIH, hepatitis, herpes, enfermedades bacterianas y fúngicas, etc. Todo ello genera un enorme gasto social y sanitario y un gran impacto en los Servicios de Salud de todo el mundo, incluyendo España. Por ello, en estos momentos es necesario buscar alternativas terapéuticas al trasplante corneal alogénico.

En este contexto, la **ingeniería tisular** constituye un conjunto de técnicas y métodos de base biotecnológica que permiten diseñar y generar en laboratorio sustitutos tisulares, tejidos artificiales o constructos de origen heterólogo o autólogo a partir de **células madre** y **biomateriales**. La fabricación en laboratorio de un sustituto corneal humano (constructo corneal o córnea artificial) es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la ingeniería tisular, siendo numerosos los laboratorios que actualmente están intentando sin demasiado éxito conseguir un sustituto corneal de calidad que pueda ser utilizado en la clínica humana (Griffith et al., 1999; Orwin et al., 2000; Reichl et al., 2003). Debido a su carácter avascular, la córnea constituye un excelente modelo para el desarrollo de un sustituto mediante ingeniería tisular. Sin embargo, la generación de una córnea artificial humana se enfrenta a numerosas dificultades, siendo especialmente compleja la generación de una matriz extracelular similar a la existente en la córnea humana normal y que

presente adecuadas propiedades biomecánicas (resistencia mecánica, elasticidad) y ópticas (transparencia, transmitancia de luz blanca y absorción de luz ultravioleta).

Recientemente, investigadores del grupo de investigación solicitante lograron diseñar nuevos biomateriales biocompatibles de origen natural, los cuales posibilitaron la generación en laboratorio del primer modelo descrito que reproducía las tres principales capas de la córnea del conejo, así como un modelo lamelar de córnea humana que incluía el estroma y el epitelio corneal humano (Alaminos et al., 2006; González-Andrades et al., 2009; Ionescu et al., 2010; Cardona et al., 2010). Para la elaboración del mencionado modelo de córnea, en primer lugar se optimizaron las condiciones y la metodología necesarias para el aislamiento y el **cultivo de células corneales** a partir de biopsias del limbo esclero-corneal, utilizando métodos enzimáticos y medios de cultivo enriquecidos con diversos factores de crecimiento. Una vez cultivadas las células epiteliales y estromales de la córnea humana, se generó una córnea humana lamelar anterior utilizando un nuevo **biomaterial** basado en una mezcla de **fibrina humana y agarosa al 0,1%** el cual permitió el crecimiento y la proliferación de las células cultivadas tanto en su espesor (queratocitos estromales) como en su superficie (células epiteliales corneales). Además, miembros del **equipo de investigación solicitante** lograron establecer y optimizar una serie de **nuevos métodos biomecánicos** que permitieron generar en laboratorio un sustituto corneal lamelar por un mecanismo de nanoestructuración, esto es, de base nanotecnológica, que hemos denominado **Córnea Artificial Humana Nanoestructurada**. Utilizando estos métodos, es posible modificar de modo estable la **estructura nanomolecular de las fibras** del biomaterial previamente diseñado por nuestro grupo de investigación (fibrina y agarosa), generando gran número de reacciones de entrecruzamiento interfibrilar y eliminando la mayor parte de las moléculas de agua y generando una matriz extracelular mucho más **estable, resistente y elástica** que la anterior, respetando la viabilidad de las células sembradas en su espesor. Este modelo de córnea artificial humana nanoestructurada ha dado lugar a una patente (P200930625), la cual se encuentra en estos momentos en fase de desarrollo tecnológico.

El análisis de estas córneas humanas artificiales nanoestructuradas demostró su analogía con la córnea humana nativa, así como adecuados niveles de transparencia al espectro de luz visible y absorción de luz ultravioleta dañina, tal como ocurre en la córnea nativa (Ionescu et al., 2010; Cardona et al., 2010). A nivel histológico, se desarrolló un epitelio estratificado en el que las células fueron capaces de expresar correctamente citoqueratinas específicas de la córnea, así como marcadores de uniones intercelulares (proteínas constituyentes de los desmosomas, las uniones estrechas y las uniones comunicantes), la membrana basal, etc, mientras que las células estromales se desarrollaron de forma adecuada, expresando vimentina a niveles comparables a los de la córnea normal (González-Andrades et al., 2009). Por otro lado, el análisis *in vivo* llevado a cabo sobre un modelo animal (conejos de laboratorio *Oryctolagus cuniculus*) demostró la plena integración de las córneas artificiales en el ojo del conejo receptor, así como la ausencia de rechazo o efectos secundarios de relevancia. De hecho, el implante lamelar del modelo de córnea artificial nanoestructurada en un grupo de animales de laboratorio mostró la adecuada manipulabilidad quirúrgica de las córneas, las cuales pudieron suturarse sin problema a la córnea receptora utilizando sutura de nylon monofilamento. Tras 6 meses de evolución, los tejidos corneales implantados se integraron adecuadamente en la córnea receptora, siendo muy difíciles de distinguir de ésta tanto mediante el examen clínico como mediante la OCT y la histología. Todo ello sugiere que las córneas artificiales generadas mediante ingeniería tisular podrían constituir adecuados sustitutos de la córnea humana para uso clínico, estableciendo así un primer paso hacia la utilización de este tipo de tejidos en la **clínica humana**. Además, es importante resaltar que todos los métodos y técnicas diseñados por los investigadores para la generación del modelo de córnea humana, así como todas las pruebas realizadas hasta la fecha para la evaluación preclínica de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas, fueron recientemente objeto de un Asesoramiento Científico por parte de la **Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)**. En dicho asesoramiento, la AEMPS confirmó la posibilidad de diseñar un ensayo clínico para evaluar el nuevo producto tisular en humanos, siendo adecuados los métodos y técnicas diseñados por el grupo investigador, incluyendo el tipo de células a utilizar y los biomateriales de fibrina y agarosa. Desde la AEMPS se señaló que los estudios preclínicos diseñados hasta la fecha permitirían diseñar un ensayo clínico en la sala GMP disponible para ello.

La aplicación clínica de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas supondría un gran impacto para el SNS. En estos momentos, el número de pacientes afectados de enfermedades corneales graves es enorme (alrededor de 65.000 lesiones oculares son causantes de baja laboral cada año en EEUU), siendo muy escasos los recursos terapéuticos disponibles en la actualidad (Peate, 2007). Los traumatismos oculares y la ulceración corneal son causas importantes de ceguera corneal a nivel mundial, ya que pueden dar lugar a 1,5-2,0 millones de casos nuevos de ceguera monocular cada año (Whitcher et al., 2001). Aunque el trasplante corneal podría solucionar una parte de los casos, los problemas derivados de la queratoplastia (listas de espera, rechazo, etc.), así como la imposibilidad de realizar este trasplante en un grupo importante de casos (casos con daño limbal, rechazos repetidos de la queratoplastia, etc.), requieren profundizar en la búsqueda de alternativas terapéuticas al trasplante corneal superficial. En este sentido, la disponibilidad de

córneas artificiales humanas generadas a partir de células de los propios pacientes y biomateriales naturales abriría las puertas al tratamiento de las enfermedades corneales graves utilizando estos medicamentos de terapias avanzadas. Debido a su origen autólogo, además, los problemas derivados de la aplicación de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas en el paciente no deberían ser relevantes. La generación de córneas artificiales humanas nanoestructuradas en el **Sistema Andaluz de Salud** pondría a éste en un primer nivel en lo referente al tratamiento de las enfermedades graves de la superficie ocular, siendo el primer Servicio de Salud capaz de ofrecer este tipo de terapia a los usuarios del Sistema Público de Salud. Además, disponer de esta tecnología en el Servicio Andaluz de Salud permitiría ofrecer productos medicinales de terapias avanzadas a otros Servicios de Salud públicos y privados de España, con el **valor añadido** para el producto que ello supone.

En este contexto, es importante señalar que las córneas artificiales humanas nanoestructuradas contempladas en esta propuesta **no presentan interés comercial**. Por un lado, el **carácter autólogo** de las córneas humanas dificulta enormemente el desarrollo industrial a partir de materiales ajenos al individuo. De hecho, tanto las células como la fibrina necesarias para generar las córneas artificiales humanas nanoestructuradas serían obtenidas a partir del propio paciente. Esto hace que se pueda comercializar, en su caso, el método conducente a la generación del tejido artificial, pero probablemente no los materiales necesarios para ello. Por otro lado, el **elevado coste** que supone la fabricación de un medicamento como Terapia Avanzada dificulta la explotación comercial del mismo, siendo necesario contar con una sala GMP, la cual ya existe en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería, estando pendiente de acreditación por la AEMPS, así como personal altamente cualificado y estrictos controles de calidad que no compensan la explotación comercial del producto tisular. Por todo ello, y puesto que estos tejidos beneficiarían a un número considerable de pacientes, su generación y distribución deben ser promovidos y coordinados por el **Sistema Público de Salud**, al menos en estas fases iniciales.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Antecedentes y estado actual del tema

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

**Solicitante: Fundación Progreso y Salud**

Bibliografía más relevante.

*(Máximo 1 página)*

1. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):503-12.
2. Dua HS, Azuara-Blanco A. Corneal allograft rejection: Risk factors, diagnosis, prevention, and treatment. *Indian J Ophthalmol* 1999;47:3-9.
3. Alaminos M, Sánchez Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS).* 2006; 47: 3311-3317.
4. González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2009; 3(6):442-449.
5. Ionescu AM, de la Cruz Cardona J, González-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, Del Mar Pérez M. UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240-400 Range. *Cornea.* 2010; 29(8):895-898.
6. Cardona JC, Ionescu AM, Gómez-Sotomayor R, González-Andrades M, Campos A, Alaminos M, Pérez MM. Transparency in a fibrin and fibrin-agarose corneal-stroma substitute generated by tissue engineering. *Cornea.* 2010 (en prensa).
7. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, Hakim M, Song Y, Watsky MA. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science.* 1999;286(5447):2169-72.
8. 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):307-19.
9. Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm.* 2003;250:191-201.
10. Peate WF. Work-related eye injuries and illnesses. *Am Fam Physician.* 2007 Apr 1;75(7):1017-22.
11. Witcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214-21.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Bibliografía más relevante

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

--

**Solicitante: Fundación Progreso y Salud**

### Hipótesis de trabajo

Una vez diseñadas las córneas artificiales humanas nanoestructuradas en el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, y tras evaluar sus adecuadas propiedades *ex vivo* y su utilidad *in vivo* mediante queratoplastia lamelar anterior en animales de laboratorio, es necesario proceder a su evaluación clínica en pacientes humanos afectados de patología corneal grave. Los resultados obtenidos durante el estudio preclínico, tanto en laboratorio como en animales de experimentación, sugieren que las córneas artificiales humanas nanoestructuradas podrían contribuir al tratamiento de diversas enfermedades corneales que cursan con pérdida de sustancia o alteración estructural grave, no existiendo efectos secundarios de relevancia.

Si se cumplen nuestras previsiones, los pacientes tratados mediante el implante lamelar de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas presentarían una mejoría clínica respecto a los pacientes control, no existiendo rechazo, granulación o alteraciones graves derivados del uso de estos tejidos artificiales de origen autólogo.

### Objetivos

#### **OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo general de este proyecto es evaluar seguridad, factibilidad e indicios de eficacia clínica del modelo previamente desarrollado de córnea artificial humana nanoestructurada en un grupo de pacientes afectados de patología corneal grave para los cuales no existe actualmente una alternativa terapéutica eficaz.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.- Generar córneas artificiales humanas nanoestructuradas lamelares de origen autólogo a partir de biopsias del limbo esclero-corneal de un grupo de pacientes y biomateriales de fibrina y agarosa.
- 2.- Implantar las córneas artificiales humanas nanoestructuradas de origen autólogo en un grupo de pacientes afectados de patología corneal grave mediante queratoplastia lamelar anterior parcial.
- 3.- Evaluar la bioseguridad de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas de origen autólogo implantadas en los pacientes para descartar efectos secundarios de relevancia.
- 4.- Evaluar los indicios de eficacia clínica de las córneas artificiales humanas nanoestructuradas de origen autólogo implantadas en los pacientes en comparación con un grupo control tratado de forma convencional que no hayan recibido las córneas artificiales por no haber presentado una mala evolución del implante de la membrana amniótica.

Ajustarse al espacio disponible

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Hipótesis y objetivos

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

**Solicitante: Fundación Progreso y Salud**

Metodología (*Máximo 3 páginas*)

**DISEÑO DEL ESTUDIO:** Estudio experimental, prospectivo y multicéntrico, abierto en el que se evaluarán la factibilidad y la bioseguridad de un nuevo medicamento de ingeniería tisular de terapias avanzadas (córnea artificial humana nanoestructurada lamelar anterior). Debido a las características del medicamento a evaluar (córnea artificial humana nanoestructurada implantada en la superficie corneal), en este caso no es posible establecer un estudio ciego o a doble ciego.

Este estudio consiste en una fase piloto e inicial en la que se incluirán de 5 a 10 pacientes. Posteriormente se prevé realizar, en base a los datos obtenidos en esta fase piloto, un ensayo clínico fase I/II en la que habrá un grupo experimental de pacientes y un grupo control de pacientes.

**POBLACIÓN DE ESTUDIO. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:** La población de estudio está constituida por pacientes afectados de úlceras corneales profundas de tipo trófico de probable evolución tórpida que acuden a Urgencias o a la consulta de los Servicios de Oftalmología implicados en este proyecto de investigación. Los pacientes seleccionados que den su consentimiento serán incluidos en el estudio. Se incluirán un total de 10 pacientes aproximadamente. Como seguimiento de este estudio, los pacientes harán unas 9 visitas programadas al centro.

.Inicialmente, para el ensayo de bioseguridad del producto, se considerarán todos los pacientes con úlceras estromales profundas de tipo trófico de probable evolución tórpida que cumplan los siguientes **criterios de inclusión:**

1. Presencia de una úlcera corneal secundaria a síndromes de ojo seco, por exposición, neuroparalíticas, neurotróficas, autoinmunes, por radioterapia, mitomicina C, causticaciones (que no asocien insuficiencia límbica completa) o úlceras tróficas de tipo idiopático. También incluimos úlceras con necrosis estromales secundarias a herpes o abscesos bacterianos, pero que no tengan infección activa y cuyo comportamiento sea similar a una úlcera trófica. También se incluirán en el estudio aquellos pacientes que presenten leucomas corneales en zona óptica, que no respondan a otros tratamientos y cuya única opción sea una queratoplastia de pronóstico incierto o una tarsorrafia
2. Tamaño de la úlcera superior a 4 mm de diámetro. Debe existir afectación estromal, pero con una profundidad que no alcance la membrana de Descemet. Localización central o periférica. Tiempo de evolución superior a 6 semanas.
3. Ausencia de afectación endotelial. Ausencia de infección ocular activa. Ausencia de insuficiencia límbica completa.
4. Úlceras que no tiendan a la resolución espontánea o que hayan presentado mala respuesta a algunos de los tratamientos habituales para úlceras tróficas: lágrimas artificiales, vendaje compresivo, cámaras húmedas, lente de contacto terapéutica, suero autólogo, adhesivos tisulares, trasplante de membrana amniótica, recubrimiento conjuntival o tarsorrafias.
5. Pacientes de ambos sexos mayores de 18 años
6. Duración de la enfermedad igual o superior a 6 semanas.
7. Pacientes que otorguen su consentimiento informado para la participación en el estudio.

Los **criterios de exclusión** serán los siguientes:

1. Ausencia de afectación estromal (por ejemplo, defectos epiteliales persistentes).
2. Úlceras de tamaño menor de 4 mm y/o tiempo de evolución inferior a 6 semanas.
3. Afectación estromal profunda que afecte a todo el espesor del estroma: úlceras perforadas y descemetocel.
4. Úlceras que respondan correctamente a tratamientos habituales.
5. Pacientes con déficit endotelial, infección ocular activa, insuficiencia límbica completa (no sería motivo de exclusión una insuficiencia límbica parcial).
6. Serología positiva para HBV, HCV o HIV
7. Coexistencia de cualquier otra patología que a criterio del investigador impida el seguimiento del paciente en el ensayo.
8. Mujeres gestantes o en periodo de lactancia
9. Mujeres en edad fértil que no utilicen un método anticonceptivo de eficacia probada
10. Pacientes que hayan sido tratados con medicación concomitante prohibida durante el mes anterior a la inclusión en el estudio.
11. Pacientes que hayan participado en los últimos 3 meses previos a la inclusión del estudio en un ensayo



clínico.

**Criterios de retirada del estudio:** Los que en cualquier momento aparecieran y estuvieran incluidos en los criterios de exclusión, aparición de enfermedades de carácter general que lo desaconsejaran, empeoramiento significativo de la situación del paciente o retirada voluntaria del estudio.

**PROCEDIMIENTO:** Una vez que los pacientes hayan sido seleccionados por la gravedad de su lesión y por su probable mal diagnóstico (enucleación o inclusión en lista de espera para trasplante corneal) y hayan firmado el consentimiento informado correspondiente, serán incluidos en este estudio. Todos ellos para el tratamiento de su patología, previamente recibirán un implante de membrana amniótica, un implante de una lente terapéutica o pegamento tisular.

En el mismo acto quirúrgico de este implante se procederá a la toma de una pequeña biopsia del limbo esclero-corneal, la cual se realizará en cada hospital implicado. La biopsia se remitirá inmediatamente a la unidad del grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada para fabricar, en la sala GMP, la córnea artificial nanoestructurada lamelar anterior.

1.) Protocolo para la toma de biopsia de limbo esclerocorneal. Puede tomarse del ojo afectado o del ojo contralateral según el oftalmólogo considere más adecuado en cada caso, previa negociación con el paciente. Bajo anestesia tópica se realiza una pequeña peritomía conjuntival, preferentemente a 12 h, se desinserta la cápsula de Tenon de su inserción limbar y se toma una biopsia de 2 x 2 mm, penetrando 1 mm en córnea y 1 mm en limbo, el grosor debe ser aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del grosor de un tapete de trabeculectomía (unos 0,2 mm), finalmente se sutura la peritomía conjuntival con vicryl rapide de 7/0, cubriendo la zona de la biopsia. Debe obtenerse el suficiente limbo para obtener una fuente de epitelio corneal y suficiente estroma para obtener una fuente de queratocitos. Todas las muestras se almacenarán en medio de transporte y preservación Optisol hasta su llegada a la unidad de procesado (sala GMP).

2.) Una vez recibida la biopsia en la sala GMP del Banco de Tejidos de Granada, se procesará ésta para la obtención de cultivos primarios de queratocitos estromales y células epiteliales. Para ello, en primer lugar se fragmentará la biopsia para obtener 4-5 pequeñas piezas de tejido, tras lo cual se procederá tal como se describe a continuación:

- Para obtener cultivos primarios epiteliales, algunos fragmentos de la biopsia (los más cercanos al limbo esclero-corneal) se depositarán en forma de explantes en frascos de cultivo Falcon, utilizando medio de cultivo de células epiteliales previamente optimizado en el grupo de investigación. Este medio está formado por tres partes de DMEM y una parte de medio HAM-F12 con suero bovino fetal (SBF) a concentración final de 10% y antibióticos-antifúngicos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B), a lo cual se añaden los siguientes factores: Adenina (24 µg/ml), Insulina (5 µg/ml), Triyodotironina (1,3 ng/ml), Toxina colérica (8 ng/ml), Hidrocortisona (0,4 µg/ml) y EGF o factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml).

- Para la generación de cultivos primarios de queratocitos estromales, algunos fragmentos de la biopsia (los más cercanos a la córnea) se digerirán en colagenasa I (2 mg/ml) a 37°C durante 6-8 horas. Tras ello, se centrifugará la mezcla para obtener las células aisladas del espesor del tejido. Estas células se cultivarán en frascos tipo Falcon con medio de cultivo DMEM suplementado con SBF (10%) y antibióticos-antifúngicos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B).

3.) Cuando se alcance la confluencia celular en ambos tipos de cultivos primarios, se procederá a la fabricación de un sustituto del estroma corneal (estroma artificial) utilizando biomateriales de fibrina y agarosa en el espesor de los cuales se cultivarán las células estromales siguiendo protocolos descritos previamente por los investigadores del equipo solicitante (patente P200930625). Para la generación de un gel de fibrina-agarosa, se utilizarán 21 ml de plasma humano procedente del propio paciente, al cual se añadirán 250.000 células resuspendidas en 800 µl de DMEM. Posteriormente, se añadirán 200 µl de ácido tranexámico como agente antifibrinolítico, cloruro cálcico 2% como agente precipitante de la reacción de gelificación y agarosa tipo VII a una concentración final del 0,1% previamente disuelta en PBS a 60°C.

Estos geles se someterán a un proceso de nanoestructuración controlada siguiendo el siguiente protocolo:

- Deshidratación parcial progresiva sobre papel de filtro estéril.
- Colocación sobre dos filtros porosos de policarbonato Millipore de 0,4 µm de diámetro de poro.
- Aplicación de 100 g de peso sobre los filtros que contienen las córneas artificiales en el biorreactor específico.
- Incubación en el biorreactor durante 10 min para inducir la reacción de entrecruzamiento nanomolecular entre las fibras de fibrina y la agarosa.
- Retirada de los filtros porosos.
- Obtención de las córneas artificiales nanoestructuradas y rehidratación parcial en medio de cultivo estéril.

Tras ello, se subcultivarán las células epiteliales sobre la superficie de los sustitutos estromales, manteniéndose éstos en cultivo en soportes porosos Transwell durante 3 semanas para favorecer la estratificación y la maduración del epitelio.

4.) Posteriormente, las córneas humanas nanoestructuradas se lavarán en PBS y se enviarán al hospital que

incluye el paciente utilizando los protocolos de envasado y transporte que se establecerán en la sala GMP y se detallarán en la solicitud de ensayo clínico para su aprobación por la AEMPS.

**5.)** Protocolo para implante del constructo autólogo. Pasadas 5 semanas, una vez recibido el constructo, se procederá a la implantación del constructo autólogo. La implantación debe ser similar al trasplante de membrana amniótica a forma de parche o escudo, cubriendo un área corneal mayor que el tamaño de la úlcera, orientando el constructo de forma que contacten estroma del paciente con estroma del constructo y la zona epitelial del constructo debe quedar anterior. El constructo tiene una consistencia bastante buena que permite su sutura a la córnea utilizando nylon de 10/0, inicialmente su aspecto es blanquecino, pero al darle tensión sobre la córnea su transparencia es bastante buena. Se cubrirá toda la úlcera con el constructo y se suturará con puntos sueltos de nylon 10-0, a una profundidad de 2/3 del estroma corneal y enterrando los cabos, procurando siempre no realizar ninguna sutura en zona óptica. Si se tratara de una úlcera periférica y parte de la sutura fuera necesario realizarla a limbo esclerocorneal, se suturará debajo de una peritomía conjuntival de la zona que sea necesaria, utilizando vicryl de 8/0 o seda de 9/0. Finalmente, se adaptará una lente de contacto terapéutica.

Tratamiento postimplante: Colirio de tobramicina-dexametasona: 2 veces al día durante 1 semana.

**VARIABLES DEL ESTUDIO:** En todos los pacientes (casos y controles), se determinarán las siguientes variables mediante examen del polo anterior con lámpara de hendidura por los especialistas de su hospital de referencia:

**1ª visita (24 h):**

- Agudeza visual.
- Persistencia o desprendimiento del constructo. Estado de la sutura. Estado de la lente terapéutica.
- Comprobar cámara anterior formada, Seidel (-).
- Transparencia.
- Infecciones.
- Control con OCT. Fotografía de polo anterior.

Tratamiento: colirio de tobramicina-dexametasona: 2 veces al día durante 1 semana.

**2ª visita (7 días):**

Agudeza visual.

- Persistencia, desprendimiento o reabsorción del constructo. Estado de la sutura. Estado de la lente terapéutica.
- Comprobar cámara anterior formada, Seidel (-). Persistencia de la úlcera o reconstrucción de estroma.
- Vascularización inducida: gradación por cuadrantes y profundidad.
- Transparencia.
- Infecciones.
- Control con OCT. Fotografía de polo anterior.

Tratamiento: colirio de tobramicina: 2 veces al día durante 1 semana.

**3ª visita (14 días):**

- Agudeza visual.
- Persistencia, desprendimiento o reabsorción del constructo. Estado de la sutura. Estado de la lente terapéutica.
- Comprobar cámara anterior formada, Seidel (-). Persistencia de la úlcera o reconstrucción de estroma.
- Vascularización inducida: gradación por cuadrantes y profundidad.
- Transparencia.
- Infecciones.
- Control con OCT. Fotografía de polo anterior.

**4ª visita (30 días)**

- Agudeza visual.
- Persistencia, desprendimiento o reabsorción del constructo. Estado de la sutura. Estado de la lente terapéutica.
- Comprobar cámara anterior formada, Seidel (-). Persistencia de la úlcera o reconstrucción de estroma.
- Vascularización inducida: gradación por cuadrantes y profundidad.
- Transparencia.
- Infecciones.
- Control con OCT. Fotografía de polo anterior.

Tratamiento: retirar lente de contacto, lagrime artificial 2 veces al día.

**5ª visita (60 días):**

- Agudeza visual.
- Persistencia, desprendimiento o reabsorción del constructo. Estado de la sutura.
- Comprobar cámara anterior formada, Seidel (-). Persistencia de la úlcera o reconstrucción de estroma.
- Vascularización inducida: gradación por cuadrantes y profundidad.

- Transparencia.
- Infecciones.
- Control con OCT. Fotografía de polo anterior.

Tratamiento: retirar sutura, lagrime artificial 2 veces al día.

Previamente a estas visitas de seguimiento tras el implante de la córnea artificial, el paciente deberá acudir al centro en 4 visitas más como mínimo: selección del paciente, firma del consentimiento informado, extracción de queratinocitos para fabricar la córnea artificial e implante de la córnea artificial.

**Aspectos ético-legales (cumplimiento BPCs, seguro...)**

El proyecto de investigación respetará los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de la (última versión aprobada en Seúl en octubre 2008), y cumplirá los requisitos establecidos en la legislación española vigente en el ámbito de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y derechos u obligaciones en materia de información y documentación clínica, la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de carácter personal, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. la Orden SCO/362/2008, de 4 de febrero, por la que se modifica la Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano y los demás requisitos establecidos en la legislación española.

Se respetarán rigurosamente las Normas de Correcta Fabricación (NCF) en la producción del medicamento de terapia celular y las Normas de Buena Práctica Clínica, CPMP/ICH/135/95, (BPC) en el desarrollo del Ensayo.

Los pacientes incluidos en el estudio estarán cubiertos por el seguro de responsabilidad que el promotor suscribirá a tal efecto.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Metodología

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

**Solicitante: Fundación Progreso y Salud**

Plan de trabajo. *(Máximo 1 página)*

**Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador** El Proyecto se desarrollará de manera uniforme durante todo el periodo de ejecución del mismo, de acuerdo con el cronograma global. La Unidad del Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada es la responsable de la producción del medicamento de ingeniería tisular. El IP es el responsable de la coordinación general del estudio. Los investigadores clínicos pertenecientes a los servicios de oftalmología de los tres hospitales se responsabilizan de la inclusión de los pacientes y del seguimiento de los mismos.

**Asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita.** Ya hay personal especializado que colabora con el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada en la supervisión de los procedimientos de producción del constructor y en la organización del transporte del producto desde la unidad de Grupo de Ingeniería Tisular hasta los centros de Sevilla, Granada y Cádiz según los protocolos de distribución validados establecidos en los Procedimientos Operativos Estandarizados de la Unidad Grupo de Ingeniería Tisular

**Lugar de realización del proyecto y centros implicados.** El estudio se llevará a cabo en los servicios de oftalmología de los Hospitales Virgen de las Nieves de Granada, Virgen Rocío de Sevilla y Puerta del Mar de Cádiz. La producción de los constructos se realizará de forma centralizadas para los tres centros en la Unidad de Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada

**Cronograma global del proyecto con su correspondiente inicio y finalización** El estudio se iniciará una vez obtenida la autorización de la AEMPS de dicho estudio y la acreditación de la sala GMP para la producción del constructo por la Unidad de de Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada (previsiblemente a mediados de 2011). El reclutamiento de los pacientes se llevará a cabo durante un año (2011). El seguimiento de 12 meses del último paciente incluido se completará previsiblemente en 2012. En los tres primeros meses de 2013 la totalidad del equipo investigador se responsabilizará de la discusión de los resultados y la publicación de los mismos.

**Cronograma de distribución de actividades por centro e investigador** Los centros incluirán los pacientes a lo largo del año 2011. Los investigadores clínicos de cada centro realizarán las correspondientes tareas de inclusión y seguimiento. El Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada se ocupará de la producción, caracterización, control y distribución de los productos de ingeniería tisular a lo largo del año de inclusión y del año posterior de seguimiento.

**Descripción de las actividades del proyecto en relación con los recursos solicitados** Los recursos solicitados se aplicarán específicamente a las siguientes actividades:

1. Contratación de CRO imprescindible para llevar a cabo el ensayo
2. Contratación del seguro obligatorio de responsabilidad civil
3. Tasas de la AEMPS y Comités Éticos
4. Contratación de personal de apoyo en cada uno de los centros implicados. Ver cuántos, dónde y titulación.
5. Material fungible y reactivos para producción del medicamento.
6. Mantenimiento de la sala GMP.
7. Transporte de las corneas de pacientes desde los Hospitales Virgen Rocío, San Cecilio y Puerta del Mar, y transporte de los productos de ingeniería tisular desde la unidad Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada a los Hospitales Virgen Rocío, San Cecilio y Puerta del Mar.
8. Reuniones de coordinación antes y durante el ensayo, reuniones de discusión y análisis de resultados a la finalización del mismo, y viajes a congresos para comunicación de resultados, para las que se solicitan recursos en el capítulo de viajes y dietas.

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

### Solicitante: Fundación Progreso y Salud

Experiencia del equipo investigador en relación con el área de estudio (5 últimos años *(Máximo 1 página)*)

El **equipo investigador** del proyecto está formado por investigadores básicos y clínicos pertenecientes al Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología (CTS-115) y especialistas en Oftalmología de diferentes Hospitales Universitarios de Granada, Sevilla y Cádiz. Se trata, por tanto, de un grupo multidisciplinar que converge en unos objetivos comunes relacionados con la evaluación clínica de las córneas artificiales nanoestructuradas previamente desarrolladas por el equipo investigador. Los miembros del Grupo de Ingeniería Tisular (CTS-115), poseen experiencia en el cultivo celular y en la generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular. El mencionado Grupo es el encargado del Master en Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada, así como del Master Propio en Fabricación de Medicamentos de Terapias Avanzadas de la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas (IATA) y la Universidad de Granada en colaboración con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Ministerio de Sanidad y Política Social). Además, el Grupo es el encargado de organizar el próximo año 2011 en Granada el próximo Congreso Europeo de la Sociedad Internacional de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa (TERMIS). Todos los investigadores mencionados han dirigido o participado en numerosos proyectos de investigación, incluyendo proyectos del Ministerio de Salud y Política Social, proyectos del Ministerio de Educación, Consejerías de Salud y de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (incluyendo proyectos de excelencia) y proyectos europeos. En el currículum de los investigadores colaboradores existen publicaciones en revistas de primer orden, incluyendo, entre otras, *Journal of Cell Physiology*, *Journal of Biomaterials Applications*, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *Experimental Eye Research*, *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS)*, *Ophthalmic Research*, *Cornea*, *Histology and Histopathology*, *Journal of Periodontal Research*, *Annals of Vascular Surgery*, *International Journal of Artificial Organs*, *Nature*, *Epigenetics*, *Nature Genetics*, *Human Genetics*, *Oncogene*, *PLoS ONE*, *Nucleic Acids Res*, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Experiencia del equipo investigador sobre el tema

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente nº

### Solicitante: Fundación Progreso y Salud

#### Financiación adicional solicitada y concedida

No se ha solicitado financiación adicional para este propósito.

#### Medios disponibles para la realización del proyecto

- Descripción de los recursos necesarios que estén disponibles en el/los centros
- Descripción de los recursos que todavía no están disponibles para la realización del estudio justificando específicamente la necesidad de estos.

El Sistema Sanitario Público Andaluz, dispone de una sala GMP específica para el desarrollo de córneas humanas artificiales nanoestructuradas como medicamentos de terapias avanzadas en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería. En esta sala GMP (promida por la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas, a través de la Fundación Progreso y Salud), que está en estos momentos en fase de validación y acreditación, existe todo el material y la infraestructura necesaria para la generación de estos tejidos artificiales en condiciones idóneas, según la legislación vigente y la normativa de la *European Medicines Agency (EMA)* y la Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). Igualmente, se dispone de todo el equipamiento necesario para llevar a cabo los estrictos controles de calidad que estos productos requieren (control es de calidad microbiológicos, de calidad de aire, etc.).

De igual modo, el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada dispone de laboratorios de análisis celular y tisular a nivel histológico, histoquímico, genético y molecular para llevar a cabo el control de calidad de los tejidos generados durante el proyecto, incluyendo microanálisis por energía dispersiva de rayos X para determinar la viabilidad celular con un alto grado de fiabilidad.

Para llevar a cabo el presente proyecto y puesto que el personal implicado en el proyecto ya está al cargo de diversos proyectos de investigación, además de tener una importante carga docente o asistencial, ha sido totalmente necesario contar con un becario de investigación predoctoral que colaborare en las tareas relacionadas con el cultivo celular, la generación de córneas artificiales nanoestructuradas, el mantenimiento de los cultivos y el control de calidad de las córneas generadas por ingeniería tisular.

Además, la realización del ensayo clínico que aquí se propone requiere disponer de fondos para material fungible, destinados a la generación de las córneas artificiales nanoestructuradas de calidad farmacéutica en la sala GMP, coordinación del ensayo, costes derivados de los seguros a contratar, mantenimiento de la sala GMP, transporte de las muestras, etc.

Ajustarse al espacio disponible

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Unidad práctica de los resultados / Medios disponibles



*“La verdadera grandeza de la ciencia  
acaba valorándose por su utilidad”.*

G. Marañón



*Capítulo 4*  
**DISCUSIÓN**





En la presente discusión, una vez expuestos los artículos y trabajos que se presentan en el marco central de esta tesis, se comparan los dos modelos de córneas humanas artificiales desarrolladas en la misma, considerando las posibles aplicaciones de ambos modelos en el contexto de la bibliografía existente. Con posterioridad, se evalúa la idoneidad de realizar un ensayo clínico en humanos de acuerdo con el protocolo propuesto y con la normativa vigente al respecto.

## **1. ESTUDIO COMPARADO DE LOS DOS MODELOS DE CÓRNEA HUMANA GENERADOS POR INGENIERÍA TISULAR**

Los trabajos expuestos en esta tesis abren varias vías en torno a la Ingeniería Tisular de la córnea. Por un lado se protocoliza la obtención de células corneales y su mantenimiento en cultivo, caracterizando a las mismas a distintos niveles para poder conformar los parámetros óptimos de viabilidad que podrán ser usados posteriormente en clínica. Por otro lado se establecen dos patrones de generación de sustitutos corneales basados en dos aproximaciones diferentes: la aplicación de los conceptos clásicos de la Ingeniería Tisular en relación con el modelo basado en la mezcla de fibrina y agarosa y la aplicación de un concepto emergente en la Ingeniería Tisular como es la descelularización, obteniendo córneas acelulares porcinas mediante la aplicación de cloruro sódico.

Ambos modelos han mostrado parámetros ópticos idóneos para su posterior implantación en humanos, así como óptimos parámetros reológicos en torno a su

resistencia y elasticidad, pudiendo así manejar los constructos corneales con facilidad y seguridad en el quirófano por parte del oftalmólogo. Sin embargo, existen varias diferencias entre ambos que podrían hacer decantarnos por uno o por otro en función de las necesidades del paciente y del equipo quirúrgico que lo asista.

En relación con el tamaño del constructo corneal que podamos desarrollar en laboratorio, hemos de tener en cuenta que en ambos productos existe la posibilidad de modelarlos según las necesidades que marque la patología corneal a tratar. Los constructos de fibrina- agarosa se pueden construir a medida desde un primer momento tanto en diámetro como en espesor, sin embargo, las córneas descelularizadas tendrán como diámetro y grosor máximo el que determine la córnea animal de la que procedan. Aún así, esto no supone una limitación ya que la córnea de cerdo es mayor tanto en diámetro como en grosor en contraposición a la córnea humana. Por ello, ambos modelos pueden ser tallados en quirófano, previamente a la realización de la queratoplastia donde serán implantados. No obstante, anteriormente al tallado, hemos de tener en consideración el grado de hidratación de los constructos, tanto en las córneas descelularizadas como en los sustitutos de fibrina-agarosa, puesto que aunque se deshidraten parcialmente en el proceso de fabricación, pueden rehidratarse al entrar en contacto con el medio de transporte usado en el proceso de conservación y traslado.

En relación con el comportamiento y manejo de las células, encontramos diferencias sustanciales en ambos modelos. La introducción de los queratocitos en los constructos de fibrina-agarosa es relativamente sencilla ya que se realiza en el mismo proceso de fabricación del gel estromal con la mezcla de fibrina, agarosa y otros

compuestos detallados ya con anterioridad. Sin embargo, la inserción de dichas células en el interior del estroma corneal descelularizado es un proceso ligeramente más complejo, al tener que liberar las células sobre la superficie del estroma una vez retiradas las células animales, y esperar así que estas penetren, migren y proliferen dentro del constructo.

El comportamiento del componente celular ya introducido en el estroma corneal artificial está marcado por la composición del constructo. Así, la adhesión y proliferación celular se ve favorecida mayormente por los componentes nativos de la matriz estromal animal, en su mayoría colágeno tipo I, en comparación con la fibrina-agarosa. Además, la maduración de los sustitutos corneales basados en fibrina-agarosa requiere una reorganización estromal significativamente mayor que los constructos basados en la técnica de descelularización-recelularización, dada la necesidad de sustituir dichos materiales por colágeno y glucosaminoglicanos, componentes ambos sintetizados por queratocitos maduros e indispensables para la correcta funcionalidad corneal a todos los niveles.

No obstante, la regeneración de las membranas basales corneales es un proceso que se ha de llevar a cabo en la maduración del constructo cuando se haya introducido el componente celular restante (epitelio y endotelio corneal). Otras estructuras corneales, como la capa de Bowman y la membrana de Descemet, deben de sintetizarse también en dicha etapa de maduración en relación con los constructos basados en fibrina-agarosa. En contraposición, los sustitutos corneales descelularizados conservan en gran medida ambas estructuras, facilitando supuestamente así la introducción del epitelio y del endotelio en el constructo corneal.

Igualmente, hemos de considerar el origen de los materiales empleados en el proceso de fabricación. Los constructos corneales de fibrina-agarosa se basan en productos autólogos como la fibrina y biocompatibles como la agarosa, evitando así el rechazo inmunológico y promoviendo con ello la adaptación del constructo en el paciente receptor. Los constructos corneales descelularizados podrían a priori conllevar un rechazo del mismo una vez implantado; sin embargo, el proceso de descelularización elimina prácticamente en su totalidad el antígeno  $\alpha$ -Gal, con lo que se contrarresta el rechazo promovido por los anticuerpos naturales que el ser humano produce frente a dicho antígeno, como se explicó con anterioridad.

Con todo ello, los distintos modelos de constructos corneales presentados en esta tesis paliarían gran parte de las deficiencias que implican los tratamientos actuales en torno a la patología corneal severa. En primer lugar, podría desechar el uso de queratoplastias anteriores, ya que los dos grandes inconvenientes que implica ésta, la escasez de donantes y la posibilidad de rechazo del injerto (Klebe *et al.*, 2009), no pueden acontecer con el uso de nuestros sustitutos corneales por el uso de células autólogas del propio paciente y el empleo de materiales biocompatibles y tolerados por el sistema inmune humano.

En segundo lugar, protocolos terapéuticos basados en el uso de membrana amniótica y plastias de conjuntiva, podrían ser suplantados también por los constructos corneales aquí estudiados. En muchos casos, estos procedimientos terapéuticos se aplican en situaciones extremas donde hay que conservar la función de barrera frente al medio externo, protegiendo así la integridad del globo ocular. Por ello, la generación de un constructo corneal con células autólogas corneales sería

inviabile, ya que el cultivo y expansión celular requiere alrededor de 20-30 días. Sin embargo, se podría estudiar el empleo de los constructos corneales sin células, a modo de sustitutos estromales acelulares, los cuales sí podrían generarse en el tiempo necesario para ser implantados en este contexto.

Existen además, una serie de limitaciones a la hora de realizar plastias con conjuntiva o membrana amniótica que contraindican parcial o totalmente su indicación: insuficiencia completa del limbo esclerocorneal, alteraciones tróficas importantes, necrosis estromal severa, isquemia severa, inflamación crónica o intensa a nivel superficial y mala función palpebral o lagrimal. Aunque algunas de estas anomalías también limitarían la viabilidad de los sustitutos corneales creados en laboratorio, como la disfunción palpebrolagrimal, otras limitaciones de tipo trófico podrían beneficiarse del implante de los sustitutos corneales, ya que las células que adicionamos en el constructo corneal implantado servirían como fuente celular para la repoblación y la renovación celular de la córnea del paciente, como se ha demostrado en diversos ensayos clínicos donde se han implantado células provenientes del limbo esclerocorneal (Vemuganti et al., 2009, Rama et al., 2010).

En último lugar, uno de los tratamientos más actuales empleados en la patología corneal severa, relacionado con LSCD, es el trasplante de limbo usando auto o aloinjertos limbares. El éxito del trasplante de LSC está determinado por una serie de factores, pudiendo verse afectado por patologías concomitantes de párpados, ojo seco y enfermedades sistémicas no controladas, por lo que se ha de tratar estos procesos previamente al trasplante de células madre limbares (Vemuganti *et al.*, 2009). Este procedimiento terapéutico representa un complemento a los constructos corneales

generados por Ingeniería Tisular, ya que el trasplante de limbo aporta una fuente de células que proliferarán y mantendrán la celularidad a nivel epitelial, sin embargo, nuestros constructos van más allá, al tratar de regenerar parte del estroma dañado.

En conclusión, los dos sustitutos corneales generados en laboratorio deben de considerarse adecuados por sus propiedades tanto fisicoquímicas como biológicas, estableciéndose gracias a estas las posibles aplicaciones de ambos modelos. Asimismo, estos constructos corneales humanos pueden enmarcarse dentro del abanico de las Terapias Avanzadas, que a día de hoy, surgen como una posibilidad terapéutica cada vez más cercana, en cuanto a su traslación clínica. El protocolo de ensayo clínico que se propone se enmarca en este contexto y se atiene a la normativa vigente en España y en Europa

## **2. TRASLACIÓN A LA CLÍNICA. MODELO DE TRASLACIÓN DEL CAH-FA COMO MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS**

Los dos modelos de córneas artificiales humanas desarrollados tienen distintas implicaciones tanto en la investigación básica como en la industria farmacéutica y cosmética, así como en la terapéutica en el contexto esta última de las Terapias Avanzadas.

En relación con la **investigación básica**, tanto el modelo basado en técnicas de descelularización como el modelo basado en materiales de fibrina-agarosa, representarían un sustrato perfecto para llevar a cabo estudios de biología celular y molecular en relación con el comportamiento de las células corneales en distintos sustratos valorando parámetros como la capacidad de migración y regeneración, así como interacciones celulares entre células propias de la córnea humana, pudiendo estudiar también interacciones de estas con otras células de estirpes distintas como células del sistema inmune.

En relación con la **industria farmacéutica y cosmética**, ambos modelos se establecen como dos fuentes con grandes perspectivas en este campo para la realización de ensayos de toxicidad y tolerabilidad de fármacos y productos cosméticos, así como para la generación de Terapias Avanzadas en base a los modelos desarrollados en esta tesis.

Los **ensayos de toxicidad y tolerabilidad de fármacos y productos cosméticos** a realizar sobre los constructos corneales serían de distintos tipos, teniendo en cuenta



los distintos modelos corneales aquí dispuestos. El modelo de córneas animales descelularizadas y recelularizadas con células humanas sería idóneo para la realización de estudios de toxicidad basados en el análisis de viabilidad celular de queratocitos corneales humanos y en la evaluación de la afectación del estroma corneal valorando la integridad de las fibras de colágeno y su orientación, junto con la concentración y distribución de proteoglicanos. Además, este modelo sería de gran ayuda para valorar el grado de penetrabilidad del fármaco o cosmético a nivel tisular a través del estroma corneal y a nivel intracelular en los queratocitos humanos.

El modelo de córnea artificial basado en fibrina-agarosa establecería un nuevo sustrato para la evaluación de los efectos tóxicos a nivel epitelial, pudiendo observar las alteraciones de las células epiteliales a nivel individual y de la afectación de sus uniones intercelulares y con la membrana basal, evaluando con ello también alteraciones en la estratificación epitelial. Asimismo, este modelo serviría para el estudio de toxicidad basado en los posible cambios inducidos en los queratocitos albergados en el estroma de fibrina-agarosa, al igual que en el modelo basado en descelularización corneal, pudiendo evaluar modificaciones en la proliferación, migración, expresión génica y otras propiedades relacionadas con el metabolismo y la viabilidad celular.

En relación con la **aplicación terapéutica**, ésta se deriva de la posible traslación a la práctica clínica de los modelos corneales descritos en la presente Tesis Doctoral. Ambos modelos pueden utilizarse para paliar las deficiencias de tratamientos agresivos actuales como los trasplantes corneales alogénicos o con el fin de ofrecer y suministrar un tratamiento basado en Terapias Avanzadas a pacientes cuya enfermedad no tiene

tratamiento o éste es deficiente. El modelo basado en técnicas de descelularización se encuentra aún en fases de desarrollo *in vitro* e *in vivo* con animales de experimentación. Por ello, la traslación clínica del mismo queda aún lejos de ser una realidad. Sin embargo, el modelo basado en fibrina-agarosa ha sido ampliamente probado y validado, tanto *in vitro* como *in vivo* en animales de experimentación, por lo que su traslación clínica se establece como un objetivo a alcanzar próximamente con la realización de un ensayo clínico en el marco de la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas impulsado por las Consejerías de Salud y de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía.

La realización de un diseño traslacional del modelo investigado para su posible incorporación a la práctica asistencial requiere la creación de un protocolo claro que marque las pautas a seguir por los distintos agentes participantes en el desarrollo de este producto mediante la realización de **ensayos clínicos** en sus distintas fases. En una fase inicial, se podrá evaluar la seguridad del producto en pacientes con mínimas posibilidades terapéuticas, mediante una estrecha vigilancia de las posibles reacciones y acontecimientos adversos, y en caso de demostrarse la seguridad y factibilidad de uso de este producto de Ingeniería Tisular, se podrán desarrollar ensayos clínicos de fases más avanzadas que permitan verificar la eficacia del mismo también en pacientes con mayores posibilidades terapéuticas.

Para la traslación clínica de los sustitutos corneales basados en fibrina-agarosa es necesario cumplir los requisitos pertinentes para la protección del paciente. Por ello, en la fabricación del producto se han de aplicar criterios GMP (del inglés “*Good Manufacturing Practices*”, o en español “Normas de Correcta Fabricación”) y la

estandarización de los protocolos en la fase de construcción en base a las guías de la EMA (Agencia Europea del Medicamento, del inglés “*European Medicines Agency*”), fundamentalmente la *GUIDELINE on human cell-based medicinal products*, de 21 de mayo de 2008; EMEA/CHMP/410869/2006. Ello implica realizar análisis de riesgo, evaluar la calidad y manufactura del producto, y tener en cuenta un conjunto de consideraciones y requisitos básicos clínicos que garantizan la idoneidad de la terapéutica a realizar.

## 2.1. ANÁLISIS DE RIESGOS:

La terapia que se describe en el protocolo propuesto se basa en la utilización médica de córneas artificiales generadas en laboratorio mediante Ingeniería Tisular a partir de células adultas y biomateriales, las cuales constituyen un medicamento de Terapia Avanzada de la categoría de Ingeniería de Tejidos según establece el REGLAMENTO (CE) No 1394/2007 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) no 726/2004; Diario Oficial de la Unión Europea de 10 de diciembre de 2007. El origen de las células y los biomateriales utilizados para generar este medicamento, así como la zona en la que ha de implantarse (la superficie ocular) nos hacen prever que el tratamiento consistente en el implante de córneas generadas mediante Ingeniería Tisular podría presentar muy escasos riesgos o efectos indeseables, siendo seguro para el paciente, tal como se detalla a continuación:

### 2.1.1. Idoneidad de los materiales utilizados

Como se indicó, el medicamento generado mediante Ingeniería Tisular está constituido por células y biomateriales.

*Células:*

Todos los ensayos llevados a cabo hasta el momento demuestran que las células humanas adultas utilizadas para generar las córneas mediante Ingeniería Tisular presentan elevados niveles de viabilidad celular (determinada mediante las técnicas más sensibles de microanálisis por energía dispersiva de rayos X), estando exentas de alteraciones genéticas o epigenéticas. De hecho, el grado de manipulación al cual serán sometidas las células no excede el ámbito de la expansión en cultivo y el subcultivo sobre biomateriales plenamente biocompatibles, no realizándose ningún tipo de manipulación genética o epigenética.

El origen de las células que se utilizan para generar las córneas por Ingeniería Tisular para uso médico puede ser doble:

- En aquellos casos en los que exista disponibilidad de obtención de biopsias del limbo-esclerocorneal sano (pacientes con afectación exclusivamente unilateral y que conservan un ojo sano), se establecerán cultivos celulares a partir de una muestra de biopsia procedente del limbo esclero-corneal del ojo sano. En este caso, el origen autólogo de las células disminuirá drásticamente la posibilidad de complicaciones derivadas del implante del producto corneal (Sangwan et al., 2006). En este punto, hemos de destacar que el tratamiento de la patología corneal utilizando cultivos autólogos de células epiteliales corneales procedentes del limbo esclero-corneal constituye una técnica previamente establecida para la cual existe experiencia clínica previa (Rama et al., 2010).
- Cuando la afectación sea bilateral o en aquellos casos en los que no sea posible obtener una biopsia de limbo esclero-corneal sano, se podrán utilizarán células de

carácter alogénico, aunque este procedimiento constituiría en sí un nuevo ensayo clínico. Para ello, se procedería, tal como se hizo en el trabajo preclínico descrito en esta tesis, a establecer cultivos celulares a partir de los anillos de limbos esclero-corneales procedentes de la donación de córneas (donante cadáver) y que hasta el momento se desechan tras la cirugía de trasplante de córnea. Hemos de destacar que la córnea es un órgano inmunológicamente privilegiado al ser avascular, por lo que el índice de rechazo de las queratoplastias realizadas rutinariamente en la clínica humana, en las cuales se utilizan córneas de donantes cadáver, es muy bajo (Nishida, 2003). Por todo ello, no es de esperar que las células alogénicas generen una respuesta inmunitaria significativa o que no pueda ser controlada mediante la instilación tópica diaria de un agente inmunosupresor.

#### *Biomateriales:*

Para la generación de los tejidos artificiales, se utiliza una mezcla de dos tipos de biomateriales biocompatibles: la fibrina y la agarosa. Por un lado, la fibrina es un material procedente del plasma humano procedente de donantes sanos o incluso del propio paciente (posibilidad de origen autólogo) que, en todo caso, es sometido a los más estrictos controles de calidad en el Centro de Transfusión Sanguínea y Banco Regional de Tejidos (Alaminos et al., 2006). Por otro, la agarosa es un hidrato de carbono de origen vegetal e inerte desde un punto de vista inmunológico, que ha sido utilizado para otros fines sin generar problemas de seguridad y que no tiene capacidad para iniciar una respuesta inmune (Garzon et al., 2009, Cao et al., 2009). Nuestro estudio de compatibilidad *in vivo* en animales de laboratorio ha demostrado que estos

biomateriales se integran de forma adecuada en el receptor sin provocar ningún tipo de rechazo o problemas de cicatrización.

### **2.1.2. Idoneidad del producto elaborado**

Los análisis realizados a las córneas CBMP generadas en el laboratorio revelan que estos medicamentos cumplen los requisitos histológicos, reológicos, ópticos y biológicos necesarios para su utilización terapéutica. Concretamente, el control de calidad efectuado hasta el momento muestra que la estructura histológica de estas córneas es la adecuada y que sus niveles de transparencia, resistencia y elasticidad son óptimos para su aplicación en la superficie corneal, tal como demuestran los ensayos *in vivo* efectuados en un modelo animal. El hecho de que estos productos medicinales se apliquen sobre una zona plenamente accesible y de muy fácil acceso (la superficie ocular) disminuye significativamente el riesgo para el paciente sometido a este tipo de terapia (Suuronen et al., 2005, Shah et al., 2008, Selvam et al., 2006).

## 2.2. CALIDAD Y MANUFACTURA

La fabricación de los productos corneales CBMP para uso medicinal descritos en esta Tesis Doctoral se realizará cumpliendo todos los principios de las normas de correcta fabricación (*good manufacturing practices* o GMP) recogidas en la Directiva 2003/94/EC y su Anexo 2, así como en la guía para productos medicinales basados en células humanas del Comité para Productos Medicinales para Uso Humano (CHMP) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA).

### 2.2.1. Materiales y productos a utilizar

#### *Células:*

En primer lugar, para generar este producto se utilizarán células humanas procedentes de la córnea y mantenidas en cultivo primario. Ya sean de origen autólogo o heterólogo, las células se cultivarán durante un reducido número de pases celulares (nunca más de 4 pases) antes de asociarse a los biomateriales para generar los CBMP corneales. Estas células se obtendrán cumpliendo los requisitos establecidos en la Directiva 2006/17/EC de la Unión Europea traspuesta al Real Decreto 1301/2006 referentes a la donación, la obtención y el control de calidad de las células y tejidos humanos para trasplante. En el caso de las células de origen alogénico, hemos de destacar que éstas procederán de tejidos sobrantes tras la cirugía del trasplante heterólogo de córnea, por lo que estos tejidos habrán superado todos los controles de calidad recogidos por la legislación vigente relacionada con la donación y el trasplante



de órganos, el RD 1301/2006, incluyendo los análisis microbiológicos más estrictos que tratan de evitar la posible transmisión de enfermedades del donante al receptor.

*Otros materiales y reactivos:*

De acuerdo con la guía para productos medicinales basados en células humanas del CHMP, todos los materiales y sustancias a utilizar para la generación de las córneas serán evaluados para asegurar su pureza y la ausencia de efectos indeseables:

1. Productos de origen humano. Para generar el producto corneal, se utilizará una muestra de suero obtenido del propio paciente al cual se aplicarán estos productos, siguiendo todos los protocolos establecidos en los Centros Regionales de Transfusión Sanguínea y Bancos de Tejidos referentes a la donación y almacenamiento de productos sanguíneos para uso autólogo.
2. Productos de origen animal. Para evitar el riesgo de transmisión de enfermedades de origen animal al hombre, especialmente aquellas causadas por priones, se utilizarán únicamente sueros bovinos procedentes de zonas geográficas exentas del equivalente bovino de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, procediéndose a la irradiación del suero previamente a su utilización en cultivo. Todo ello se realizará siguiendo la guía para el uso de suero bovino para la generación de productos medicinales biológicos humanos (CPMP/BWP/1793/02). Los cultivos celulares primarios, tal como se detalla en el trabajo preclínico previamente realizado, se llevarán a cabo en ausencia de células alimentadoras de origen animal.

3. Consideraciones especiales. El uso de agarosa como biomaterial para la generación de CBMP corneales demostró estar exento de riesgos en nuestros análisis previos realizados en animales de experimentación.

### **2.2.2. Proceso para la generación de córneas por Ingeniería Tisular.**

La producción de las córneas se realizará cumpliendo en todo momento los requerimientos establecidos para ello (normas de correcta fabricación o GMP), realizándose todo el proceso en una sala GMP especialmente diseñada para este tipo de producto y que ya ha sido construida en el Banco de Tejidos del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada-Almería. Dicha sala GMP posee un área específicamente destinada a cultivo y producción celular y tisular plenamente equipada con cámaras de cultivo celular y cabinas de flujo laminar, y otro área para el envasado de los productos CBMP generados, cumpliendo todos los requisitos establecidos para ello en la legislación vigente.

La descripción completa de los materiales y el procedimiento que se utilizan para fabricar los CBMP corneales se ha detallado ya en el capítulo 3 de esta tesis. Se resume aquí de forma escueta las etapas principales, especificando algunos aspectos de la elaboración aplicando GMP.

#### *Procedimientos para preparación de las células a utilizar*

Todas las células a utilizar en el proceso serán procesadas de acuerdo con todas las normas de correcta fabricación, evitándose toda manipulación innecesaria o que

podiese alterar la estructura celular o la carga genética de las células. Una vez obtenidas las biopsias de tejido del limbo esclero-corneal humano, éstas se procesarán del siguiente modo:

- **Disociación tisular.** Para aislar las células estromales y epiteliales del limbo, las biopsias se incubarán en una solución de tripsina-EDTA siguiendo protocolos previamente optimizados por numerosos investigadores para el aislamiento de células de la piel, la mucosa oral, la córnea y diversos otros tipos de tejidos (Garzon et al., 2009, Mariappan et al., 2010, Llames et al., 2004).
- **Aislamiento de las poblaciones celulares de interés.** Puesto que cada tipo celular se obtendrá de un tejido diferente, y que la presencia de células de distinta estirpe en el seno de los cultivos no es un problema relevante, en este protocolo no se contempla el aislamiento de las poblaciones celulares previamente a su utilización.
- **Cultivo celular.** Para el cultivo de las células estromales de la córnea (queratocitos) se utilizarán medios básicos de cultivo suplementados con suero bovino fetal de origen australiano con certificado de estar libre de agentes patógenos, incluyendo priones y enfermedad de Creutzfeldt- Jakob. Para el cultivo de las células epiteliales, estos medios se enriquecerán con distintas hormonas y factores de crecimiento cuyo origen ha de garantizar la ausencia de efectos adversos o transmisión de enfermedades.
- **Modificación celular.** Las células no serán modificadas en su fenotipo o genotipo durante el proceso.
- **Cultivo en matrices extracelulares.** Como se describió, las células estromales se cultivarán en el espesor de biomateriales de fibrina humana y agarosa, los cuales han

demostrado excelentes niveles de adaptabilidad y biocompatibilidad a las células humanas.

#### *Controles intraproceso*

Todo el proceso de fabricación del producto corneal será controlado al inicio, durante sus pasos intermedios y en el producto final. Para ello, se tomarán muestras para análisis microbiológico, de estabilidad genética, epigenético e histológico en cada uno de los puntos del proceso y en el medio de cultivo cada vez que se renueve el medio en los cultivos celulares.

#### *Definición de los lotes*

Para asegurar la trazabilidad y la consistencia de todo el proceso, se definirán exactamente los lotes, las fechas de producción y caducidad, el origen y la localización de cada uno de los productos a utilizar, incluyendo los frascos, los medios de cultivo, los factores de crecimiento, el suero bovino fetal y todos los materiales y reactivos a utilizar. En todo momento, se utilizarán productos farmacéuticos aprobados para uso clínico. Siempre que sea posible, se utilizarán productos de origen vegetal o generados mediante ingeniería de ADN recombinante. Los productos de origen animal se restringirán al máximo, utilizándose únicamente aquellos cuya procedencia garantice la ausencia de riesgos derivados de enfermedades xenogénicas.

#### *Sistemas contenedores*

Todos los materiales de envasado cumplirán lo establecido en la directiva europea sobre instrumentos médicos (Medical Devices Directive 93/42/EEC), garantizándose la esterilidad y la ausencia de tóxicos en los mismos.

El desarrollo del ensayo clínico de acuerdo con el protocolo propuesto quedaría enmarcado en la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas, la cual aporta apoyo legal, económico y personal para la realización de este tipo de ensayos. Gracias a sus responsables, se ha construido un laboratorio GMP para la fabricación de sustitutos corneales humanos basados en el modelo desarrollado en esta tesis, con el fin de poder cumplir parte de los requisitos anteriormente mencionados.

### 2.3. REQUISITOS CLÍNICOS PARA EL IMPLANTE DE LOS CONSTRUCTOS CORNEALES

El protocolo de un ensayo clínico con hemicórneas anteriores autólogas basadas en constructos de fibrina agarosa, ha de empezar la inclusión de pacientes con lesiones corneales, no pudiendo efectuarse con voluntarios sanos por razones éticas. De este modo, se tomará una biopsia de limbo esclerocorneal de donde se obtendrán las células corneales, y una vez realizado el constructo corneal, se implantará realizando una queratoplastia lamelar, como ya se ha descrito anteriormente. En relación con el protocolo para la realización de dicha fase, hemos de tener en cuenta algunos requisitos y consideraciones en relación a la selección y preparación del paciente, y a la elección de la técnica quirúrgica a emplear para el implante del constructo corneal en el paciente.

#### 2.3.1. Consideraciones preoperatorias

La selección cuidadosa de los pacientes y la preparación del paciente puede en parte determinar si el resultado de una DALK se considera un éxito tanto por el cirujano como por el paciente. Los principales parámetros para la selección de los pacientes son (Reinhard and Larkin, 2006):

##### *Densidad de células endoteliales*

El buen estado del endotelio receptor es un requisito previo para un procedimiento lamelar. Aunque relativamente poco frecuentes, las córneas con un trastorno corneal anterior también pueden tener un endotelio comprometido, debido

a una enfermedad combinada, la propia enfermedad o la medicación prolongada (por ejemplo, las distrofias combinadas o queratitis por herpes simple virus / endotelitis).

#### *Mal pronóstico para la realización de queratoplastia penetrante*

En pacientes en los que un procedimiento penetrante convencional está contraindicado, la rehabilitación visual completa no suele ser el principal objetivo. En estos casos, debe considerarse la realización de una disección de profundidad relativamente superficial (70-80%), lo que reduce enormemente el riesgo de perforación durante la cirugía, por ejemplo, el queratocono extremo en el síndrome de Down o queratitis herpéticas recurrentes de larga evolución.

#### *La edad del paciente*

Los pacientes jóvenes con un trastorno corneal como el queratocono aislado pueden beneficiarse más de un procedimiento lamelar. La pérdida de células endoteliales tras la queratoplastia lamelar muestra un patrón similar al de la pérdida de células fisiológicas en una córnea virgen, mejorando así significativamente la expectativa a largo plazo para la supervivencia del injerto. Dado que la integridad del globo se conserva en un procedimiento lamelar y el riesgo de ruptura o dehiscencia de la herida puede ser relativamente baja, una queratoplastia lamelar puede dar menos restricciones para la realización de ciertos deportes y otras actividades diarias que son relativamente importantes para un paciente joven. Con un procedimiento lamelar, el riesgo de rechazo del injerto también puede reducirse considerablemente, lo que

puede dar menos restricciones a las personas que viajan o viven en países con un sistema de salud menos accesible.

#### *Constitución atópica*

Los resultados a largo plazo de cualquier tipo de procedimiento relacionado con queratoplastia pueden ser relativamente pobres en pacientes con enfermedad atópica o trastornos cutáneos faciales concurrentes. La aparición de complicaciones graves y de larga evolución, tales como defectos epiteliales persistentes, infiltrados alrededor de la sutura y adelgazamientos corneales parciales es relativamente frecuente en estos casos y difíciles de manejar.

#### *Preparación psicológica del paciente*

Se recomienda que se modifiquen debidamente las expectativas del paciente, ya que las actuales técnicas quirúrgicas de queratoplastia, en general, no ofrecen resultados visuales similares a la operación de cataratas operación con la que están familiarizados muchos de ellos. Un procedimiento lamelar siempre conlleva el riesgo de perforación y la ulterior conversión a un procedimiento penetrante, debiendo de explicar al paciente que se intentará una queratoplastia lamelar, pero que la cirugía puede tornarse en un procedimiento penetrante convencional, a pesar de que el riesgo de perforación con algunas técnicas puede ser alrededor de un 5%. El paciente también debe ser informado de que puede ser necesario poco después de la queratoplastia la realización de una cirugía secundaria para posicionar el injerto correctamente.



### 2.3.2. Consideraciones quirúrgicas del implante del constructo corneal

La técnica a realizar para la implantación de éste se basará en los procedimientos descritos por diversos autores para la realización de queratoplastias lamelares anteriores, en función del material disponible, del conocimiento de la técnica por el cirujano y de la valoración del riesgo en función de la elección de la técnica y la patología del paciente.

Teniendo en cuenta la indicación, la presencia de una contraindicación para la queratoplastia penetrante, y la anatomía de cada paciente, el cirujano ha de considerar primero si la perforación intraoperatoria es inaceptable y qué profundidad desea alcanzar en la disección. Como ya hemos descrito anteriormente en el cuerpo de esta tesis, la disección alcanzará en esta primera fase del ensayo una profundidad de 2/3 aproximadamente, siempre que sea posible, con el fin de asegurar el mantenimiento de la integridad estructural de la córnea receptora. Una vez que se confirme la bioseguridad y tolerabilidad de nuestro constructo corneal, procederemos en el futuro a realizar DALK mediante disecciones con una profundidad de más del 90% o una separación de la membrana de Descemet en el estroma posterior receptor, lo cual conllevará los mejores resultados postoperatorios. Entre los distintos tipos de DALK que podrían realizarse encontramos (Reinhard and Larkin, 2006):

- Disección de la membrana de Descemet (MD) mediante aire o viscoelástico: La separación de la membrana de Descemet del estroma posterior mediante la disección con aire (técnica de la gran burbuja de Anwar) o viscodisección tiene la ventaja de crear una superficie anatómica ideal donde entren en contacto donante y receptor, con el menor riesgo posible por ello de desarrollar una

región de turbidez entre ambos. El método de disección es indirecto (no controlado manualmente, pero depende de la presión a la que somete el aire o el viscoelástico al plano por encima de la membrana de Descemet) y, en consecuencia, si se produce una perforación, ésta tiende a ser paracentral y de gran tamaño, requiriendo a menudo una reconversión a queratoplastia penetrante. De ahí, que el cirujano tal vez elija tener accesible una córnea donante con un endotelio de calidad.

- Disección corneal manual a una profundidad controlada visualmente: Para controlar la profundidad de la disección durante la cirugía, la cámara anterior se rellena con aire para crear un plano de referencia óptica con el que el cirujano puede realizar una disección de profundidad hasta el 90-95%, eliminando la mayor parte del estroma corneal afecto. También se pueden aplicar otras técnicas manuales sin la necesidad de rellenar con aire la cámara anterior como la técnica “divide y vencerás”, descrita por Tsubota. La visualización de la profundidad que alcanza el instrumental de disección reduce enormemente el riesgo de perforación (menos del 5%). Si se produce dicha perforación, ésta es generalmente pequeña y se localiza a 12 horas o en la periferia. Si es necesario, la perforación puede sellarse diseccionando superficialmente por encima de ésta, colocando encima un flap de estroma corneal. Por lo tanto, el número de casos que requieran la conversión a un procedimiento penetrante es bajo, por lo que la disponibilidad de un donante de córnea con endotelio de buena calidad no es obligatoria.

- Disección láser: El uso del láser excimer o de femtosegundo para crear un lecho para el injerto lamelar, junto con el uso de la topografía y la paquimetría, permiten que pacientes con una superficie irregular o un estroma adelgazado puedan ser intervenidos de DALK con las máximas garantías. Sin embargo, no todo el software actual permite realizar disecciones de más de 400  $\mu\text{m}$  de profundidad.





*“La ciencia es el gran antídoto contra el veneno del entusiasmo y la superstición”.*

*Adam Smith*



*Capítulo 5*

*CONCLUSIONES*



De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, pueden emitirse las siguientes conclusiones:

- 1. En relación con la necesidad de optimizar el aislamiento de las distintas estirpes celulares que se hallan en la córnea, con el fin de establecer cultivos celulares viables susceptibles de ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular para su posible uso terapéutico:**

La técnica de cultivo que desarrollamos en la presente Tesis Doctoral demostró una elevada eficiencia a la hora de generar cultivos celulares viables de queratocitos y células epiteliales corneales útiles para la construcción de córneas artificiales mediante Ingeniería Tisular, sin que se generen alteraciones artefactuales significativas.

- 2. En relación con la determinación de la viabilidad de las células endoteliales corneales responsables del mantenimiento de la homeostasis de la estructura corneal:**

Nuestros resultados microscópicos y microanalíticos demuestran la viabilidad de las células de los cuatro primeros subcultivos para su utilización en Ingeniería Tisular de acuerdo con el contenido iónico intracelular



establecido por microscopía electrónica analítica de energía dispersiva de Rayos X. Nuestros resultados ponen asimismo de relieve los patrones de expresión génica y los niveles de contenido iónico que determinan la integridad de la barrera endotelial de la córnea.

**3. En relación con la elaboración de un constructo de CAH mediante la utilización de biomateriales de fibrina y agarosa, y el establecimiento de sus patrones de calidad histológico y fisiológico:**

Nuestros resultados permiten la elaboración de córneas artificiales humanas de carácter lamelar, utilizando biomateriales de fibrina-agarosa y células madre procedentes de córnea humana. El estudio evolutivo del proceso de diferenciación y maduración epitelial mediante inmunofluorescencia y microarray, pone de relieve el desarrollo progresivo de distintos mecanismos de unión intercelular que conducen a la formación de una barrera epitelial análoga a la existente en la córnea humana nativa. El estudio óptico del estroma corneal artificial humano elaborado por Ingeniería Tisular demuestra la transparencia del constructo y su capacidad para absorber radiación UV-A y B de modo análogo al estroma corneal nativo.

- 4. En relación con la elaboración de un constructo de CAH aplicando técnicas de descelularización-recelularización, y el establecimiento de sus patrones de calidad histológico y fisiológico:**

Nuestros resultados demuestran que las córneas descelularizadas de cerdo constituyen un soporte histológico y óptico adecuado para la elaboración de un constructo artificial recelularizado con queratocitos humanos, de posible aplicación en futuros protocolos de Terapias Avanzadas.

- 5. Los resultados derivados de la presente Tesis Doctoral permiten en el momento presente elaborar un protocolo de Ensayo Clínico de acuerdo con las directrices establecidas por las normativas españolas y europeas, para su posible traslación a la clínica en el marco de los programas de Terapias Avanzadas.**

*The following conclusions may be issued from the results obtained in this Thesis:*

***1. Regarding the need of optimizing the isolation of different cell types found in the cornea, in order to establish viable cell cultures that can be used in Tissue Engineering protocols for possible therapeutic use:***

*The culture technique developed in this thesis demonstrated high efficiency to generate viable keratocytes and corneal epithelial cell cultures that can be used for the construction of artificial corneas using tissue engineering techniques, without generating significant artifactual changes.*

***2. In connection with determining the viability of corneal endothelial cells which are responsible for maintaining the homeostasis of the corneal structure:***

*Our microscopic and microanalytical results demonstrate the viability of the cells of the first four subcultures for being used in tissue engineering according to the intracellular ionic content established by analytical electron microscopy, energy dispersive X-ray. Our results also emphasize the gene expression patterns and ion content levels that determine the integrity of the endothelial barrier of the cornea.*

**3. In connection with the preparation of CAH construct using fibrin and agarose biomaterials, and the establishment of histological and physiological quality patterns:**

*These results support the development of human lamellar artificial corneas, using fibrin-agarose biomaterials and stem cells from human cornea. The evolutionary study of the process of epithelial differentiation and maturation by immunofluorescence and microarray emphasizes the progressive development of different mechanisms of intercellular junction leading to the formation of an epithelial barrier similar to that in native human cornea. The optical study of tissue engineered human artificial corneal stroma demonstrates that the transparency of the construct and its ability to absorb UV-A and B in a manner similar to the native corneal stroma.*

**4. In connection with the development of a CAH construct using decellularization-recellularization techniques and establishing histological and physiological quality standards:**

*The results show that the decellularized pig corneas are a histological and optical media suitable for the development of an artificial construct with humans keratocytes in it, which could be used in future protocols for Advanced Therapies.*

***5. The results from this thesis facilitates the development of a clinical trial protocol in accordance with the guidelines established by the Spanish and European regulations for possible translation to the clinic as part of the programs for Advanced Therapies.***





*“La ciencia es la progresiva aproximación  
del hombre al mundo real”.*

Max Planck



*Capítulo 6*

*BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS*





## 1. BIBLIOGRAFÍA

- AL-AQABA, M. A., FARES, U., SULEMAN, H., LOWE, J. & DUA, H. S. (2010) Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol*, 94, 784-9.
- ALAMINOS, M., DEL CARMEN SANCHEZ-QUEVEDO, M., MUNOZ-AVILA, J. I., SERRANO, D., MEDIALDEA, S., CARRERAS, I. & CAMPOS, A. (2006) Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 3311-7.
- AMANO, S. (2003) Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*, 22, S66-74.
- AMANO, S., SHIMOMURA, N., YOKOO, S., ARAKI-SASAKI, K. & YAMAGAMI, S. (2008) Decellularizing corneal stroma using N<sub>2</sub> gas. *Mol Vis*, 14, 878-82.
- AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY. (2005) *Fundamentals and principles of ophthalmology, 2005-2006*, San Francisco, CA, American Academy of Ophthalmology.
- AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY. (2006) *External disease and cornea*, San Francisco, Calif., American Academy of Ophthalmology.
- ARRUGA, H. (1963) *Cirugía Ocular*, Salvat Editores.
- AZUARA-BLANCO, A., PILLAI, C. T. & DUA, H. S. (1999) Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*, 83, 399-402.
- BADDON, A., JONES, M., ARMITAGE, J., WARWICK, R. & KAYE, S. (2010) A review of allograft ophthalmic tissue in eye surgery. *Cell Tissue Bank*, 11, 29-38.
- BADYLAK, S. F. (2004) Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*, 12, 367-77.
- BENEDEK, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye. *Appl Opt*, 10, 459-73.
- BENTLEY, E., MURPHY, C. J., LI, F., CARLSSON, D. J. & GRIFFITH, M. (2010) Biosynthetic corneal substitute implantation in dogs. *Cornea*, 29, 910-6.
- BEUERMAN, R. W. & PEDROZA, L. (1996) Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech*, 33, 320-35.
- CAMPOS, A. (2004) *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina Madrid, Real Academia Nacional de Medicina*
- CAO, Z., GILBERT, R. J. & HE, W. (2009) Simple agarose-chitosan gel composite system for enhanced neuronal growth in three dimensions. *Biomacromolecules*, 10, 2954-9.
- CEN, L., LIU, W., CUI, L., ZHANG, W. & CAO, Y. (2008) Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*, 63, 492-6.
- CID LEDESMA, E., CID LEDESMA, M., CORTÉS GABAUDAN, F., LEDESMA MARTÍN, M., MARCHENA, M., PEDRERO, P. & UREÑA BRACE, J. (2007) *Diccionario Medicobiológico (histórico y etimológico) de helenismos* Ediciones Universidad de Salamanca.

- CINTRON, C., HONG, B. S., COVINGTON, H. I. & MACARAK, E. J. (1988) Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29, 767-75.
- COGAN, D. G. (1949) Studies on the clinical physiology of the cornea; the interrelationship of corneal turgescence, epithelial edema, bullous keratopathy, and interstitial vascularization. *Am J Ophthalmol*, 32, 625-33.
- CREUZET, S., VINCENT, C. & COULY, G. (2005) Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol*, 49, 161-71.
- CHEN, Z., DE PAIVA, C. S., LUO, L., KRETZER, F. L., PFLUGFELDER, S. C. & LI, D. Q. (2004) Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*, 22, 355-66.
- DAPENA, I., HAM, L. & MELLE, G. R. (2009) Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK--the thinner the better? *Curr Opin Ophthalmol*, 20, 299-307.
- DE MIGUEL, M. P., ALIO, J. L., ARNALICH-MONTIEL, F., FUENTES-JULIAN, S., DE BENITO-LLOPIS, L., AMPARO, F. & BATAILLE, L. (2010) Cornea and ocular surface treatment. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5, 195-204.
- DI GIROLAMO, N., CHUI, J., WAKEFIELD, D. & CORONEO, M. T. (2007) Cultured human ocular surface epithelium on therapeutic contact lenses. *Br J Ophthalmol*, 91, 459-64.
- DOGRU, M. & TSUBOTA, K. (2005) Current concepts in ocular surface reconstruction. *Semin Ophthalmol*, 20, 75-93.
- DOILLON, C. J., WATSKY, M. A., HAKIM, M., WANG, J., MUNGER, R., LAYCOCK, N., OSBORNE, R. & GRIFFITH, M. (2003) A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int J Artif Organs*, 26, 764-73.
- DOWNES, J. & HOLMES, R. (1992) Development of aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in mouse eye: evidence for light-induced changes. *Biol Neonate*, 61, 118-23.
- DRAVIDA, S., GADDIPATI, S., GRIFFITH, M., MERRETT, K., LAKSHMI MADHIRA, S., SANGWAN, V. S. & VEMUGANTI, G. K. (2008) A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation. *J Tissue Eng Regen Med*, 2, 263-71.
- DUAN, D., KLENKLER, B. J. & SHEARDOWN, H. (2006) Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices*, 3, 59-72.
- DUAN, X., MCLAUGHLIN, C., GRIFFITH, M. & SHEARDOWN, H. (2007) Biofunctionalization of collagen for improved biological response: scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 78-88.
- DUAN, X. & SHEARDOWN, H. (2006) Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials*, 27, 4608-17.
- ENGLER, C., KELLIHER, C., SPECK, C. L. & JUN, A. S. (2009) Assessment of attachment factors for primary cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*, 28, 1050-4.

- ESPANA, E. M., KAWAKITA, T., ROMANO, A., DI PASCUALE, M., SMIDDY, R., LIU, C. Y. & TSENG, S. C. (2003) Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 5130-5.
- FAN, X. Q., CHEN, P. & FU, Y. (2007) [Xenogenic corneal acellular matrix as carrier for reconstruction of biological cornea epithelium-scaffold-endothelium compound]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 43, 437-41.
- FANG, X. F., ZHAO, J., SHI, W. Y. & XIE, L. X. (2008a) [Biocompatibility of acellular corneal stroma and transplantation of tissue-engineered corneal epithelium]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 44, 934-42.
- FANG, X. F., ZHAO, J., SHI, W. Y. & XIE, L. X. (2008b) [Reconstruction tissue-engineered corneal epithelium using xenogeneic acellular corneal stroma as scaffold]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 44, 825-30.
- FRANCIS, D., ABBERTON, K., THOMPSON, E. & DANIELL, M. (2009) Myogel supports the ex-vivo amplification of corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*, 88, 339-46.
- FREUND, D. E., MCCALLY, R. L. & FARRELL, R. A. (1986) Direct summation of fields for light scattering by fibrils with applications to normal corneas. *Appl Opt*, 25, 2739.
- FU, Y., FAN, X., CHEN, P., SHAO, C. & LU, W. (2010) Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. *Cells Tissues Organs*, 191, 193-202.
- FUNAMOTO, S., NAM, K., KIMURA, T., MURAKOSHI, A., HASHIMOTO, Y., NIWAYA, K., KITAMURA, S., FUJISATO, T. & KISHIDA, A. (2010) The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*, 31, 3590-5.
- FUNDERBURGH, J. L. (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*, 10, 951-8.
- GARZON, I., SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., MOREU, G., GONZALEZ-JARANAY, M., GONZALEZ-ANDRADES, M., MONTALVO, A., CAMPOS, A. & ALAMINOS, M. (2009) In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res*, 44, 588-97.
- GILBERT, T. W., SELLARO, T. L. & BADYLAK, S. F. (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27, 3675-83.
- GOLDMAN, J. N. & BENEDEK, G. B. (1967) The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol*, 6, 574-600.
- GOMAA, A., COMYN, O. & LIU, C. (2010) Keratoprotheses in clinical practice - a review. *Clin Experiment Ophthalmol*, 38, 211-24.
- GOMES, J. A., GERALDES MONTEIRO, B., MELO, G. B., SMITH, R. L., CAVENAGHI PEREIRA DA SILVA, M., LIZIER, N. F., KERKIS, A., CERRUTI, H. & KERKIS, I. (2010) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1408-14.
- GOMES, J. A., ROMANO, A., SANTOS, M. S. & DUA, H. S. (2005) Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*, 16, 233-40.

- GONZALEZ-ANDRADES, M., CARDONA, J. D., IONESCU, A. M., CAMPOS, A., PEREZ, M. D. & ALAMINOS, M. (2010) Generation of Bioengineered Corneas with Decellularized Xenografts and Human Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- GONZALEZ-ANDRADES, M., GARZON, I., GASCON, M. I., MUNOZ-AVILA, J. I., SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., CAMPOS, A. & ALAMINOS, M. (2009) Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med*.
- GORDON, R. A. & DONZIS, P. B. (1985) Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol*, 103, 785-9.
- GOSPODAROWICZ, D., GREENBURG, G. & ALVARADO, J. (1979) Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium. The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol*, 97, 2163-9.
- HASHIMOTO, Y., FUNAMOTO, S., SASAKI, S., HONDA, T., HATTORI, S., NAM, K., KIMURA, T., MOCHIZUKI, M., FUJISATO, T., KOBAYASHI, H. & KISHIDA, A. (2010) Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 3941-8.
- HASSELL, J. R., CINTRON, C., KUBLIN, C. & NEWSOME, D. A. (1983) Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. *Arch Biochem Biophys*, 222, 362-9.
- HIRAOKA, Y., KIMURA, Y., UEDA, H. & TABATA, Y. (2003) Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly(glycolic acid) fiber. *Tissue Eng*, 9, 1101-12.
- HORNBY, S. J., XIAO, Y., GILBERT, C. E., FOSTER, A., WANG, X., LIANG, X., JING, H., WANG, L., MIN, W., SHI, Y. & LI, Y. (1999) Causes of childhood blindness in the People's Republic of China: results from 1131 blind school students in 18 provinces. *Br J Ophthalmol*, 83, 929-32.
- JESTER, J. V. (2008) Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol*, 19, 82-93.
- JESTER, J. V., BUDGE, A., FISHER, S. & HUANG, J. (2005) Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2369-78.
- JESTER, J. V., LEE, Y. G., HUANG, J., HOUSTON, J., ADAMS, B., CAVANAGH, H. D. & PETROLL, W. M. (2007) Postnatal corneal transparency, keratocyte cell cycle exit and expression of ALDH1A1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 4061-9.
- JESTER, J. V., PETROLL, W. M. & CAVANAGH, H. D. (1999) Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res*, 18, 311-56.
- JOYCE, N. C. & HARRIS, D. L. (2010) Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors. *Mol Vis*, 16, 897-906.
- KHODADOUST, A. & QUINTER, A. P. (2003) Microsurgical approach to the conjunctival flap. *Arch Ophthalmol*, 121, 1189-93.
- KLEBE, S., COSTER, D. J. & WILLIAMS, K. A. (2009) Rejection and acceptance of corneal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*, 14, 4-9.

- KOIZUMI, N., COOPER, L. J., FULLWOOD, N. J., NAKAMURA, T., INOKI, K., TSUZUKI, M. & KINOSHITA, S. (2002) An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2114-21.
- KOLLI, S., AHMAD, S., LAKO, M. & FIGUEIREDO, F. (2010) Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*, 28, 597-610.
- KRACHMER, J. H., MANNIS, M. J. & HOLLAND, E. J. (2005) *Cornea*, Philadelphia, Elsevier/Mosby.
- LAGALI, N., GERMUNDSSON, J. & FAGERHOLM, P. (2009) The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 4192-8.
- LAI, J. Y., CHEN, K. H. & HSIUE, G. H. (2007) Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation*, 84, 1222-32.
- LASS, J. H., GAL, R. L., RUEDY, K. J., BENETZ, B. A., BECK, R. W., BARATZ, K. H., HOLLAND, E. J., KALAJIAN, A., KOLLMAN, C., MANNING, F. J., MANNIS, M. J., MCCOY, K., MONTOYA, M., STULTING, D. & XING, D. (2005) An evaluation of image quality and accuracy of eye bank measurement of donor cornea endothelial cell density in the Specular Microscopy Ancillary Study. *Ophthalmology*, 112, 431-40.
- LAVKER, R. M., DONG, G., CHENG, S. Z., KUDOH, K., COTSARELIS, G. & SUN, T. T. (1991) Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, 1864-75.
- LAWRENCE, B. D., MARCHANT, J. K., PINDRUS, M. A., OMENETTO, F. G. & KAPLAN, D. L. (2009) Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 1299-308.
- LEIBOWITZ, H. M. & WARING, G. O. (1998) *Corneal disorders : clinical diagnosis and management*, Philadelphia, Saunders.
- LI, D. Q., CHEN, Z., SONG, X. J., DE PAIVA, C. S., KIM, H. S. & PFLUGFELDER, S. C. (2005) Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res*, 80, 581-90.
- LI, W., HAYASHIDA, Y., CHEN, Y. T. & TSENG, S. C. (2007) Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res*, 17, 26-36.
- LIM, L. S., HOW, A. C., ANG, L. P. & TAN, D. T. (2009a) Gundersen flaps in the management of ocular surface disease in an Asian population. *Cornea*, 28, 747-51.
- LIM, P., FUCHSLUGER, T. A. & JURKUNAS, U. V. (2009b) Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol*, 24, 139-48.
- LIN, X. C., HUI, Y. N., WANG, Y. S., MENG, H., ZHANG, Y. J. & JIN, Y. (2008) Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit. *Vet Ophthalmol*, 11, 61-6.
- LIU, C., HILLE, K., TAN, D., HICKS, C. & HEROLD, J. (2008) Keratoprosthesis surgery. *Dev Ophthalmol*, 41, 171-86.

- LLAMES, S. G., DEL RIO, M., LARCHER, F., GARCIA, E., GARCIA, M., ESCAMEZ, M. J., JORCANO, J. L., HOLGUIN, P. & MEANA, A. (2004) Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*, 77, 350-5.
- MARFURT, C. F., COX, J., DEEK, S. & DVORSCAK, L. (2010) Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*, 90, 478-92.
- MARIAPPAN, I., MADDILETI, S., SAVY, S., TIWARI, S., GADDIPATI, S., FATIMA, A., SANGWAN, V. S., BALASUBRAMANIAN, D. & VEMUGANTI, G. K. (2010) In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc*, 5, 1470-9.
- MAURICE, D. M. (1957) The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*, 136, 263-86.
- MCLAUGHLIN, C. R., ACOSTA, M. C., LUNA, C., LIU, W., BELMONTE, C., GRIFFITH, M. & GALLAR, J. (2010) Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs. *Biomaterials*, 31, 2770-8.
- MCLAUGHLIN, C. R., FAGERHOLM, P., MUZAKARE, L., LAGALI, N., FORRESTER, J. V., KUFFOVA, L., RAFAT, M. A., LIU, Y., SHINOZAKI, N., VASCOTTO, S. G., MUNGER, R. & GRIFFITH, M. (2008) Regeneration of corneal cells and nerves in an implanted collagen corneal substitute. *Cornea*, 27, 580-9.
- MEANA, A., IGLESIAS, J., DEL RIO, M., LARCHER, F., MADRIGAL, B., FRESNO, M. F., MARTIN, C., SAN ROMAN, F. & TEVAR, F. (1998) Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*, 24, 621-30.
- MEEK, K. M., LEONARD, D. W., CONNON, C. J., DENNIS, S. & KHAN, S. (2003) Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye*, 17, 927-36.
- MERGLER, S. & PLEYER, U. (2007) The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res*, 26, 359-78.
- MERRETT, K., FAGERHOLM, P., MCLAUGHLIN, C. R., DRAVIDA, S., LAGALI, N., SHINOZAKI, N., WATSKY, M. A., MUNGER, R., KATO, Y., LI, F., MARMO, C. J. & GRIFFITH, M. (2008) Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 3887-94.
- MI, S., CHEN, B., WRIGHT, B. & CONNON, C. J. (2010) Ex vivo construction of an artificial ocular surface by combination of corneal limbal epithelial cells and a compressed collagen scaffold containing keratocytes. *Tissue Eng Part A*, 16, 2091-100.
- MIMURA, T., YAMAGAMI, S., YOKOO, S., USUI, T., TANAKA, K., HATTORI, S., IRIE, S., MIYATA, K., ARAIE, M. & AMANO, S. (2004) Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2992-7.
- MIRI, A., AL-DEIRI, B. & DUA, H. S. (2010) Long-term outcomes of autolimbic and allolimbic transplants. *Ophthalmology*, 117, 1207-13.
- MODINO, S. A. & SHARPE, P. T. (2005) Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol*, 50, 255-8.

- MOLLER-PEDERSEN, T. (2004) Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res*, 78, 553-60.
- MOLLER-PEDERSEN, T., CAVANAGH, H. D., PETROLL, W. M. & JESTER, J. V. (1998) Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea*, 17, 627-39.
- MOURANT, J. R., CANPOLAT, M., BROCKER, C., ESPONDA-RAMOS, O., JOHNSON, T. M., MATANOCK, A., STETTER, K. & FREYER, J. P. (2000) Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *J Biomed Opt*, 5, 131-7.
- MULLER, L. J., PELS, L. & VRENSEN, G. F. (1995) Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 2557-67.
- MYUNG, D., KOH, W., BAKRI, A., ZHANG, F., MARSHALL, A., KO, J., NOOLANDI, J., CARRASCO, M., COCHRAN, J. R., FRANK, C. W. & TA, C. N. (2007) Design and fabrication of an artificial cornea based on a photolithographically patterned hydrogel construct. *Biomed Microdevices*, 9, 911-22.
- NAKAGAWA, S., NISHIDA, T., KODAMA, Y. & ITOI, M. (1990) Spreading of cultured corneal epithelial cells on fibronectin and other extracellular matrices. *Cornea*, 9, 125-30.
- NAKAYAMA, K. H., BATCHELDER, C. A., LEE, C. I. & TARANTAL, A. F. (2010) Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 16, 2207-16.
- NIE, X., JIN, Y., TIAN, W., ZHANG, C., LEI, J. & CHEN, X. (2006) [The reconstruction of bioengineer active corneal stroma and its biocompatibility study]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 23, 878-81.
- NIKNEJAD, H., PEIROVI, H., JORJANI, M., AHMADIANI, A., GHANA VI, J. & SEIFALIAN, A. M. (2008) Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15, 88-99.
- NISHIDA, K. (2003) Tissue engineering of the cornea. *Cornea*, 22, S28-34.
- NISHIDA, K., YAMATO, M., HAYASHIDA, Y., WATANABE, K., MAEDA, N., WATANABE, H., YAMAMOTO, K., NAGAI, S., KIKUCHI, A., TANO, Y. & OKANO, T. (2004a) Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, 77, 379-85.
- NISHIDA, K., YAMATO, M., HAYASHIDA, Y., WATANABE, K., YAMAMOTO, K., ADACHI, E., NAGAI, S., KIKUCHI, A., MAEDA, N., WATANABE, H., OKANO, T. & TANO, Y. (2004b) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351, 1187-96.
- NOTARA, M., ALATZA, A., GILFILLAN, J., HARRIS, A. R., LEVIS, H. J., SCHRADER, S., VERNON, A. & DANIELS, J. T. (2010) In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Res*, 90, 188-95.
- NOTARA, M. & DANIELS, J. T. (2008) Biological principals and clinical potentials of limbal epithelial stem cells. *Cell Tissue Res*, 331, 135-43.
- NUBILE, M., DUA, H. S., LANZINI, T. E., CARPINETO, P., CIANCAGLINI, M., TOTO, L. & MASTROPASQUA, L. (2008) Amniotic membrane transplantation for the



- management of corneal epithelial defects: an in vivo confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol*, 92, 54-60.
- OH, J. Y., KIM, M. K., LEE, H. J., KO, J. H., WEE, W. R. & LEE, J. H. (2009) Processing porcine cornea for biomedical applications. *Tissue Eng Part C Methods*.
- PANG, K., DU, L. & WU, X. (2010) A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials*, 31, 7257-65.
- PAUKLIN, M., FUCHSLUGER, T. A., WESTEKEMPER, H., STEUHL, K. P. & MELLER, D. (2010) Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol*, 45, 57-70.
- PEI, Y., REINS, R. Y. & MCDERMOTT, A. M. (2006) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 3A1 expression by the human keratocyte and its repair phenotypes. *Exp Eye Res*, 83, 1063-73.
- PELLEGRINI, G., TRAVERSO, C. E., FRANZI, A. T., ZINGIRIAN, M., CANCEDDA, R. & DE LUCA, M. (1997) Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349, 990-3.
- PONCE MARQUEZ, S., MARTINEZ, V. S., MCINTOSH AMBROSE, W., WANG, J., GANTXEGUI, N. G., SCHEIN, O. & ELISSEEFF, J. (2009) Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater*, 5, 1839-47.
- PRABHASAWAT, P., TESAVIBUL, N. & KOMOLSURADEJ, W. (2001) Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol*, 85, 1455-63.
- PRICE, F. W. & PRICE, M. O. (2008) Adult keratoplasty: has the prognosis improved in the last 25 years? *Int Ophthalmol*, 28, 141-6.
- PROULX, S., AUDET, C., UWAMALIYA, J., DESCHAMBEAULT, A., CARRIER, P., GIASSON, C. J., BRUNETTE, I. & GERMAIN, L. (2009) Tissue engineering of feline corneal endothelium using a devitalized human cornea as carrier. *Tissue Eng Part A*, 15, 1709-18.
- QUANTOCK, A. J. & YOUNG, R. D. (2008) Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn*, 237, 2607-21.
- RAFAT, M., LI, F., FAGERHOLM, P., LAGALI, N. S., WATSKY, M. A., MUNGER, R., MATSUURA, T. & GRIFFITH, M. (2008) PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 3960-72.
- RAMA, P., MATUSKA, S., PAGANONI, G., SPINELLI, A., DE LUCA, M. & PELLEGRINI, G. (2010) Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*, 363, 147-55.
- REICHL, S., BEDNARZ, J. & MULLER-GOYMANN, C. C. (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*, 88, 560-5.
- REICHL, S. & MULLER-GOYMANN, C. C. (2003) The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm*, 250, 191-201.

- REINHARD, T. & LARKIN, D. F. P. (2006) *Cornea and external eye disease*, Berlin ; New York, Springer.
- RUBERTI, J. W. & ZIESKE, J. D. (2008) Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res*, 27, 549-77.
- SANGWAN, V. S., MATALIA, H. P., VEMUGANTI, G. K., FATIMA, A., IFTHEKAR, G., SINGH, S., NUTHETI, R. & RAO, G. N. (2006) Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol*, 54, 29-34.
- SANGWAN, V. S., VEMUGANTI, G. K., IFTEKHAR, G., BANSAL, A. K. & RAO, G. N. (2003) Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury: a case report of unique application. *Cornea*, 22, 478-81.
- SASAKI, S., FUNAMOTO, S., HASHIMOTO, Y., KIMURA, T., HONDA, T., HATTORI, S., KOBAYASHI, H., KISHIDA, A. & MOCHIZUKI, M. (2009) In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis*, 15, 2022-8.
- SAX, C. M., KAYS, W. T., SALAMON, C., CHERVENAK, M. M., XU, Y. S. & PIATIGORSKY, J. (2000) Transketolase gene expression in the cornea is influenced by environmental factors and developmentally controlled events. *Cornea*, 19, 833-41.
- SCHROETER, J. & RIECK, P. (2009) Endothelial evaluation in the cornea bank. *Dev Ophthalmol*, 43, 47-62.
- SCHWAB, I. R., REYES, M. & ISSEROFF, R. R. (2000) Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea*, 19, 421-6.
- SCHWARTZ, E. C., HUSS, R., HOPKINS, A., DADJIM, B., MADJITOLOUM, P., HENAULT, C. & KLAUSS, V. (1997) Blindness and visual impairment in a region endemic for onchocerciasis in the Central African Republic. *Br J Ophthalmol*, 81, 443-7.
- SELVAM, S., THOMAS, P. B. & YIU, S. C. (2006) Tissue engineering: current and future approaches to ocular surface reconstruction. *Ocul Surf*, 4, 120-36.
- SHAH, A., BRUGNANO, J., SUN, S., VASE, A. & ORWIN, E. (2008) The development of a tissue-engineered cornea: biomaterials and culture methods. *Pediatr Res*, 63, 535-44.
- SHAO, Y., QUYANG, L., ZHOU, Y., TANG, J., TAN, Y., LIU, Q., LIN, Z., YIN, T., QIU, F. & LIU, Z. (2010) Preparation and physical properties of a novel biocompatible porcine corneal acellularized matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46, 600-5.
- SITALAKSHMI, G., SUDHA, B., MADHAVAN, H. N., VINAY, S., KRISHNAKUMAR, S., MORI, Y., YOSHIOKA, H. & ABRAHAM, S. (2009) Ex vivo cultivation of corneal limbal epithelial cells in a thermoreversible polymer (Mebiol Gel) and their transplantation in rabbits: an animal model. *Tissue Eng Part A*, 15, 407-15.
- SMELSER, K. & OZANICS, V. (1956) Studies on the differentiation of the cornea and sclera of the rabbit. *Anatomical Records*, 124, 362.
- SRINIVAS, S. P. (2010) Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci*, 87, E239-54.
- SUDHA, B., MADHAVAN, H. N., SITALAKSHMI, G., MALATHI, J., KRISHNAKUMAR, S., MORI, Y., YOSHIOKA, H. & ABRAHAM, S. (2006) Cultivation of human corneal

- limbal stem cells in Mebiol gel--A thermo-reversible gelation polymer. *Indian J Med Res*, 124, 655-64.
- SUGITA, J. & KONDO, J. (1997) Deep lamellar keratoplasty with complete removal of pathological stroma for vision improvement. *Br J Ophthalmol*, 81, 184-8.
- SUURONEN, E. J., SHEARDOWN, H., NEWMAN, K. D., MCLAUGHLIN, C. R. & GRIFFITH, M. (2005) Building in vitro models of organs. *Int Rev Cytol*, 244, 137-73.
- TAKACS, L., TOTH, E., BERTA, A. & VEREB, G. (2009) Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A*, 75, 54-66.
- TALBOT, M., CARRIER, P., GIASSON, C. J., DESCHAMBEAULT, A., GUERIN, S. L., AUGER, F. A., BAZIN, R. & GERMAIN, L. (2006) Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*, 12, 65-75.
- THANOS, M., PAUKLIN, M., STEUHL, K. P. & MELLER, D. (2010) Ocular Surface Reconstruction With Cultivated Limbal Epithelium in a Patient With Unilateral Stem Cell Deficiency Caused by Epidermolysis Bullosa Dystrophica Hallopeau-Siemens. *Cornea*.
- TORBET, J., MALBOUYRES, M., BUILLES, N., JUSTIN, V., ROULET, M., DAMOUR, O., OLDBERG, A., RUGGIERO, F. & HULMES, D. J. (2007) Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials*, 28, 4268-76.
- TSAI, R. J., LI, L. M. & CHEN, J. K. (2000) Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*, 343, 86-93.
- VEMUGANTI, G. K., FATIMA, A., MADHIRA, S. L., BASTI, S. & SANGWAN, V. S. (2009) Limbal stem cells: application in ocular biomedicine. *Int Rev Cell Mol Biol*, 275, 133-81.
- VRANA, N. E., BUILLES, N., JUSTIN, V., BEDNARZ, J., PELLEGRINI, G., FERRARI, B., DAMOUR, O., HULMES, D. J. & HASIRCI, V. (2008) Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 5325-31.
- VRANA, N. E., ELSHEIKH, A., BUILLES, N., DAMOUR, O. & HASIRCI, V. (2007) Effect of human corneal keratocytes and retinal pigment epithelial cells on the mechanical properties of micropatterned collagen films. *Biomaterials*, 28, 4303-10.
- WANG, D. Y., HSUEH, Y. J., YANG, V. C. & CHEN, J. K. (2003) Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4698-704.
- WHITCHER, J. P., SRINIVASAN, M. & UPADHYAY, M. P. (2001) Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*, 79, 214-21.
- WU, Z., ZHOU, Y., LI, N., HUANG, M., DUAN, H., GE, J., XIANG, P. & WANG, Z. (2009) The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials*, 30, 3513-22.
- XU, F., LI, Y., DENG, Y. & XIONG, J. (2008a) Porous nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite hydrogel as artificial cornea fringe: characterization and evaluation in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed*, 19, 431-9.

- XU, Y. G., XU, Y. S., HUANG, C., FENG, Y., LI, Y. & WANG, W. (2008b) Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis*, 14, 2180-9.
- YANG, B., ZHANG, Y., ZHOU, L., SUN, Z., ZHENG, J., CHEN, Y. & DAI, Y. (2010) Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*.
- YANOFF, M. & FINE, B. S. (2002) *Ocular pathology*, Philadelphia, Mosby.
- YEN, A. H. & SHARPE, P. T. (2006) Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 6, 9-16.
- ZENG, Y., YANG, J., HUANG, K., LEE, Z. & LEE, X. (2001) A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech*, 34, 533-7.
- ZHANG, C., JIN, Y., NIE, X., LIU, Y., LEI, J. & HU, D. (2006) [A comparative study on biocompatibility of acellular corneal stroma materials prepared by serial digestion methods]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 20, 185-8.
- ZHANG, C., NIE, X., HU, D., LIU, Y., DENG, Z., DONG, R., ZHANG, Y. & JIN, Y. (2007) Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. *Cell Tissue Res*, 329, 249-57.
- ZHANG, S. J., YANG, Z. M., DENG, L., LUO, J. C. & LI, X. Q. (2005) [Preparation of xenogenic corneal stroma and its cytoconsistency]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 27, 670-3.
- ZINN, K. M. & MOCKEL-POHL, S. (1975) Fine structure of the developing cornea. *Int Ophthalmol Clin*, 15, 19-37.



## 2. ANEXOS

### 2.1. LISTADO DE ABREVIATURAS

- 5FU: 5-fluoraracilo
- ALDH: aldehído deshidrogenasa
- CAH-DR: córneas artificiales humanas basadas en técnicas de descelularización-recelularización
- CAH-FA: córneas artificiales humanas basadas en constructos de Fibrina-Agarosa
- CBMP: Productos medicinales basados en células (del inglés, “*cell-based medicinal products*”)
- CHMP: Comité para Productos Medicinales para Uso Humano
- CSPG: condroitin sulfato
- DALK: queratoplastia lamelar anterior profunda (del inglés, “*deep anterior lamellar keratoplasty*”)
- DEP: defectos epiteliales persistentes
- DNA o ADN: ácido desoxirribonucleico
- EMA: Agencia Europea del Medicamento (del inglés, “*European Medicines Agency*” )
- G3PDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
- GMP: Normas de Correcta Fabricación (del inglés, “*Good Manufacturing Practices*”)

- IR: índice de refracción
- KSPG: keratan sulfato
- LESC: células madre epiteliales limbares (del inglés, "*limbal epithelial stem cells*")
- LSC: células madre limbares (del inglés, "*limbal stem cells*")
- LSCD: deficiencia de células madre limbares (del inglés, "*limbal stem cell deficiency*")
- MA: membrana amniótica
- MD: membrana de Descemet
- MEB: microscopía electrónica de barrido
- MET: microscopía electrónica de transmisión
- MMC: mitomicina C
- NaCl: Cloruro sódico
- NaOH: hidróxido de sodio
- PHEMA: poli-2-hidroxietilmetacrilato
- PMMA: polimetilmetacrilato
- PTFE: politetrafluoruro expandido
- RNA o rna: ácido ribonucleico
- SDS: dodecilsulfato sódico
- TKT: transketolasa
- Tris-EDTA: tripsina- ácido etilendiaminotetraacético
- UVA: ultravioleta A
- UVB: ultravioleta B

## 2.2. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

### **FIGURAS:**

**Figura 1:** Esquema anatómico del globo ocular a nivel anterior, indicándose las distintas partes que lo componen (1: córnea, 2: esclera, 3: iris, 4: cuerpo ciliar, 5: cristalino, 6: zónula de Zinn). Elaboración propia.

**Figura 2:** Esquema representativo de la inervación corneal. Se observan los nervios periféricos estromales (marrón oscuro) penetrando a través del limbo esclerocorneal (línea discontinua). En un plano superior aparece el plexo subbasal (azul), convergiendo en un punto a modo de vórtice (asterisco) en el cuadrante inferonasal. Modificado de (Marfurt et al., 2010).

**Figura 3:** Corte histológico de la córnea humana teñido con hematoxilina-eosina (1: Epitelio; 2: Capa de Bowman; 3: Estroma; 4: Membrana de Descemet; 5: Endotelio).

**Figura 4:** Gráfico representativo de la estructura corneal (MET y MEB: microscopía electrónica de transmisión y barrido, respectivamente). Modificado de (Leibowitz and Waring, 1998) y (Muller et al., 1995).

**Figura 5:** Gráfico representativo de la diferenciación de las LESC. Modificado de (Notara and Daniels, 2008).

**Figura 6:** Requisitos para la implantación de la queratoprótesis BostonKpro.



**FIGURAS REPRESENTATIVAS DE LOS DISTINTOS CAPÍTULOS:**

**Agradecimientos:** Santiago Ramón y Cajal.

**Resumen/Abstract:** Ex-libris de la biblioteca del Institute of Ophthalmology and Moorfields Eye Hospital, Londres.

**Índice:** Rosalind Franklin, Francis Crick, James Watson y Maurice Wilkin.

**Introducción:** Ramón Castroviejo.

**Justificación y objetivos:** José Ignacio e Ignacio Barraquer.

**Relación de artículos y trabajos científicos:** Severo Ochoa.

**Discusión:** Exilio español.

**Conclusiones:** Globo ocular y anexos.

**Bibliografía y anexos:** Libros.

**TABLAS:**

**Tabla 1:** Principales indicaciones para la realización de queratoplastia penetrante o lamelar.

**Tabla 2:** Principales indicaciones para la realización de un recubrimiento conjuntival o plastia con membrana amniótica.

**Tabla 3:** Principales indicaciones para el uso de queratoprótesis.

**Tabla 4:** Clasificación de las patologías corneales causantes de la deficiencia limbar según su causa.

**Tabla 5:** Distintos sustratos usados por varios grupos para el cultivo de células limbares epiteliales.

**Tabla 6:** Protocolos de descelularización aplicados a la córnea hasta la fecha.

