



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**UTILIDAD DE LA INGENIERÍA TISULAR EN EL
TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CORNEALES**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ IGNACIO MUÑOZ ÁVILA

2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Ignacio Muñoz Ávila
D.L.: Gr. 1224- 2006
ISBN: 978-84-338-4012-7

UTILIDAD DE LA INGENIERÍA TISULAR EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CORNEALES

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía
José Ignacio Muñoz Ávila
Para aspirar al título de Doctor.

Fdo.: José Ignacio Muñoz Ávila

Vº Bº El Director de Tesis

Vº Bº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Ignacio Carreras Egaña
Doctor en Medicina y Cirugía.
Universidad de Granada

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

Departamento de Cirugía y sus Especialidades.
Universidad de Granada.
2006

Esta **Tesis Doctoral** ha sido realizada en las instalaciones del **Departamento de Histología de la Universidad de Granada** y en las instalaciones de la **Unidad de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada**.

El artículo “**Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold**”, basado en esta Tesis Doctoral, ha sido aceptado para su publicación por la revista *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, considerada la revista con mayor factor de impacto en el área de la oftalmología.



AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este trabajo, me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la consecución del mismo.

A mi querido amigo el Dr. Miguel Alaminos, director de esta Tesis Doctoral. Han pasado ya varios años desde aquella conversación en la que Miguel me contaba sus proyectos para realizar ingeniería tisular en los campos de la dermatología y la odontología, y yo le comentaba las posibilidades que en ese campo podían ofrecer la oftalmología y las células madre del limbo esclerocorneal. Pocas semanas después, Miguel se presentaba en mi casa con un proyecto de investigación fruto del cual nace esta Tesis Doctoral. Gracias por haberme animado a trabajar en este proyecto, por contagiarme tu entusiasmo día a día y por haber sido un ejemplo de constancia y de capacidad de trabajo. Aunque trabajar contigo es un lujo, el verdadero lujo es contar con tu amistad.

Al Profesor Ignacio Carreras, también director de esta Tesis Doctoral, ilusionado desde el primer instante con este proyecto, por aportar su conocimiento en la patología córnea, su experiencia en cirugía y en investigación, el instrumental quirúrgico imprescindible y por su continua orientación y buenos consejos. Además, muchas gracias por tu apoyo en las comunicaciones a congresos.

Al Profesor Antonio Campos, principal impulsor de este proyecto, por posibilitar el desarrollo de la ingeniería tisular en Granada (y en España), por contagiarme su ilusión en este trabajo, por su disposición constante y por sus imprescindibles aportaciones haciéndonos encontrar soluciones a los problemas.

A mis dos jefes, el Dr. Daniel Serrano y el Dr. Santiago Medialdea por haber aportado su importantísima experiencia en el trasplante de córnea, así como haberme guardado los limbos de vuestras cirugías. Gracias por haberos acordado de coger el teléfono para avisarme, siempre que ibais a hacer una queratoplastia.

A mi otro jefe, D. Teodoro, y a todo el personal del Servicio de Oftalmología del hospital de Baza: Mercedes, D. Lino, Carmen, Aurora, Nieves, y M^a Jesús por animarme y por vuestra amistad.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en cuyas instalaciones se ha llevado a cabo la mayor parte de este trabajo, donde siempre se me han abierto las puertas y donde he encontrado un gran ambiente de colaboración.

Al Dr. José Luis García, por su interés y sus valiosas aportaciones, y al resto del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario San Cecilio por su colaboración, cariño, simpatía y amabilidad.

A los residentes de oftalmología del Hospital Universitario San Cecilio y del Hospital Virgen de las Nieves, y en especial a Amina y M^a del Mar, futuras eminencias de la oftalmología, que “casi” siempre han colaborado cuando las he necesitado. Y a aquellos residentes que se han sentido animados en iniciar una nueva experiencia en la investigación y han comenzado a trabajar en este campo.

Al personal de la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, por su colaboración y su buen hacer en el cuidado y mantenimiento de los conejos, el quirófano y el instrumental quirúrgico.

A mi familia, por su compañía y cariño inestimables.

A mi esposa, Pilar, por su paciencia durante todo este tiempo sin “apenas” quejarse. Gracias por tu compañía y apoyo incondicional en todo momento y por aguantarme todo el rato hablando de mis células y de mis córneas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. La córnea.....	2
1.1. Introducción.....	2
1.1.1. Función óptica.....	2
1.1.2. Función de barrera frente a agentes externos.....	3
1.2. Anatomía e histología de la córnea.....	4
1.2.1. Epitelio corneal.....	5
1.2.2. Membrana de Bowman.....	8
1.2.3. Estroma corneal.....	8
1.2.3.1 Matriz extracelular del estroma corneal.....	9
1.2.3.2. Componente celular del estroma corneal.....	11
1.2.4. Membrana de Descemet.....	13
1.2.5. Endotelio corneal.....	14
1.3. Fisiología de la córnea.....	16
1.3.1. Nutrición corneal.....	16
1.3.2. Mantenimiento del epitelio corneal.....	16
1.3.3. Respuesta ante las heridas corneales.....	17
1.3.4. Inervación de la córnea.....	19
1.4. Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio.....	20
1.5. Patología corneal severa y su tratamiento quirúrgico.....	22
1.5.1. Queratoplastia penetrante.....	22
1.5.2. Queratoplastia lamelar.....	24
1.5.3. Queratoprótesis.....	25
2. El limbo esclerocorneal.....	26
2.1. Introducción.....	26
2.2. Anatomía e histología del limbo esclerocorneal.....	27
2.3. Patología del limbo esclerocorneal y su tratamiento quirúrgico.....	29
2.3.1 Clasificación del déficit de células madre limbares.....	30
2.3.2. Técnicas quirúrgicas.....	30
2.3.2.1. Autotransplante de limbo autólogo.....	30
2.3.2.2. Transplante de limbo alogénico.....	31
2.3.2.3. Transplante de membrana amniótica.....	31
2.3.2.4. Expansión de células madre autólogas, <i>ex vivo</i>	31
3. La ingeniería tisular.....	33
3.1. Conceptos generales de ingeniería tisular.....	33
3.1.1. Tecnología celular.....	33
3.1.2. Tecnología de constructos.....	35
3.1.3. Integración en un sistema vivo.....	36
3.2. Ingeniería tisular de la córnea.....	37
3.2.1. Prótesis corneales artificiales (queratoprótesis).....	38
3.2.2. Prótesis corneales biológicas (equivalentes corneales).....	41
II OBJETIVOS.....	43

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
1. Obtención de córneas y limbos esclerocorneales de conejos de laboratorio.....	47
2. Desarrollo de cultivos primarios de células procedentes de la córnea del conejo de laboratorio.....	53
2.1. Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales Corneales.....	53
2.2. Aislamiento y cultivo de Células Epiteliales Corneales.....	54
2.3. Aislamiento y cultivo de Queratocitos Estromales.....	58
3. Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de la córnea.....	59
4. Congelación de células.....	60
5. Desarrollo de matrices extracelulares: elaboración de sustitutos del estroma corneal...	61
5.1. Fabricación de geles de agarosa al 2%.....	61
5.2. Fabricación de geles de fibrina humana.....	62
5.3. Fabricación del geles de agarosa más fibrina.....	63
5.4. Fabricación de geles de colágeno.....	64
6. Construcción de equivalentes corneales mediante ingeniería tisular.....	65
7. Evaluación microscópica de los equivalentes corneales.....	67
8. Inmunohistoquímica.....	70
9. Análisis estadístico.....	72
IV. RESULTADOS.....	73
1. Generación de cultivos primarios de células corneales.....	74
1.1. Cultivo de células de epitelio corneal de conejo.....	74
1.2. Cultivo de queratocitos estromales.....	77
1.3. Células de endotelio corneal de conejo.....	79
2. Caracterización genética de las células corneales mantenidas en cultivos primarios.....	82
3. Construcción de equivalentes corneales de espesor completo.....	84
3.1. Sustitutos estromales fabricados con geles de agarosa 2%.....	84
3.2. Sustitutos estromales fabricados con geles de fibrina humana.....	85
3.3. Sustitutos estromales fabricados con geles de fibrina y agarosa al 0.1%.....	86
3.4. Sustitutos estromales fabricados con geles de colágeno tipo I.....	88
4. Evaluación microscópica de los equivalentes corneales.....	89
4.1. Los equivalentes corneales presentan un epitelio estratificado equivalente al de las córneas control.....	89
4.2. Los sustitutos estromales de fibrina y agarosa son estructuralmente análogos al estroma corneal nativo y permiten el crecimiento de los queratocitos en su interior...	94
4.3. El endotelio corneal es capaz de crecer y formar una monocapa en la base de los sustitutos estromales.....	98
5. Expresión de proteínas específicas en los equivalentes corneales.....	99

V. DISCUSIÓN.....	101
1. ¿Por qué fabricar equivalentes corneales organotípicos?.....	102
2. Cultivo de las tres estirpes celulares de la córnea del conejo de laboratorio.....	105
2.1. Cultivo de células de endotelio corneal.....	105
2.2. Cultivo de células corneales estromales.....	107
2.3. Cultivo de células de epitelio corneal.....	107
2.4. Identificación de células corneales mediante análisis de expresión de genes con RT-PCR.....	108
3. Construcción de equivalentes corneales de la córnea del conejo de laboratorio.....	109
3.1. Técnica secuencial de cultivo, utilizando sustitutos estromales.....	109
3.2. Desarrollo de sustitutos estromales.....	110
3.2.1. Modelos de equivalentes corneales contruidos con un sustituto estromal a base de agarosa 2%.....	111
3.2.2. Sustitutos estromales a base de fibrina humana.....	111
3.2.3. Equivalente corneal construido con un sustituto estromal a base de fibrina y agarosa al 0.1%.....	112
3.2.4. Modelos de equivalentes corneales contruidos con un sustituto estromal a base de colágeno tipo I.....	113
4. Problemas pendientes de solucionar. Retos para el futuro.....	114
4.1. Cultivo de endotelio humano.....	114
4.2. Inervación de los equivalentes corneales.....	115
4.3. Mejorar la consistencia para una adecuada manipulación quirúrgica.....	116
4.4. Mejorar la transparencia y capacidad refractiva de los equivalentes corneales.....	116
VI. CONCLUSIONES.....	117
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología de la córnea humana.....	4
Figura 2. Epitelio corneal.....	5
Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de adhesión del epitelio corneal a la membrana basal y a la membrana de Bowman.....	8
Figura 4. Estroma corneal.....	9
Figura 5. Disposición de las capas de colágeno en el estroma corneal.....	10
Figura 6. Queratocitos estromales.....	12
Figura 7. Endotelio corneal.....	14
Figura 8. Hipótesis del movimiento celular.....	17
Figura 9. Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio.....	21
Figura 10. Aspecto clínico de una córnea transplantada.....	23
Figura 11. Rechazo del injerto corneal alogénico.....	23
Figura 12. Representación esquemática del epitelio del limbo esclerocorneal.....	26
Figura 13. Citología de la córnea de un paciente con insuficiencia limbal grave.....	29
Figura 14. Técnicas quirúrgicas utilizadas en el tratamiento de la patología límbica grave.....	32
Figura 15. Ejemplos de prótesis corneales artificiales (queratoprótesis).....	39
Figura 16. Representación esquemática de un hidrogel asociado a un material poroso periférico.....	40
Figura 17. Jaulas-animatorio especiales para conejos de experimentación.....	49
Figura 18. Mesa de operaciones.....	50
Figura 19. Extracción de córneas y limbos esclerocorneales de conejos de laboratorio....	51
Figura 20. Aislamiento del limbo esclerocorneal a partir de córneas de conejo desprovistas de endotelio.....	57
Figura 21. Cultivo subconfluente de células alimentadoras 3T3 de embrión de ratón.....	58
Figura 22. Gel de agarosa al 2% sobre una placa de Petri estéril para cultivo celular.....	62
Figura 23. Preparación de sustitutos estromales de fibrina humana.....	63
Figura 24. Preparación de geles de colágeno.....	64
Figura 25. Sistemas de cultivo Transwell con membranas porosas de 0.4 µm.....	66
Figura 26. Elaboración de sustitutos corneales utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo porosos Transwell.....	67
Figura 27. Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200.....	69
Figura 28. Técnica de cultivo celular epitelial a partir de explantes de limbo esclerocorneal en ausencia de células alimentadoras 3T3.....	75
Figura 29. Imagen de microscopía de contraste de fases de un cultivo confluyente de células epiteliales de la córnea.....	75
Figura 30. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivos de epitelio corneal de conejo de laboratorio en presencia de células alimentadoras 3T3 inactivadas.....	76
Figura 31. Imágenes de microscopía óptica de cultivos de queratocitos estromales de córnea de conejo de laboratorio.....	78
Figura 32. Imágenes de microscopía de contraste de fases del endotelio corneal cultivado del conejo de laboratorio.....	80
Figura 33. Fotografía obtenida mediante el microscopio electrónico de barrido de células endoteliales corneales mantenidas en cultivo.....	81
Figura 34. Análisis de expresión del ARNm correspondiente a los genes VIM, COL8 y KRT12 en células corneales cultivadas, mediante RT-PCR.....	83
Figura 35. Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su interior.....	84

Figura 36. Geles de fibrina humana con queratocitos en su espesor, para ser utilizados como sustitutos estromales.....	85
Figura 37. Constructo corneal fabricado a partir de sustitutos estromales de fibrina y agarosa al 0,1% con queratocitos inmersos en su interior.....	86
Figura 38. Sutura simple de nylon de 10/0, realizada sobre un constructo corneal fabricado a partir un sustituto estromal de fibrina y agarosa al 0,1%.....	87
Figura 39. Queratocitos estromales inmersos en un gel de fibrina-agarosa 0,1%.....	87
Figura 40. Equivalentes corneales de espesor completo, construidos con sustitutos estromales a base de colágeno tipo I.....	88
Figura 41. La evaluación mediante MO de los constructos corneales demostró la presencia de un epitelio corneal estratificado.....	90
Figura 42. Superficie epitelial de los constructos corneales generados mediante ingeniería tisular.....	91
Figura 43. El análisis ultraestructural del epitelio de los constructos corneales reveló la presencia de numerosas uniones intercelulares tipo desmosoma.....	92
Figura 44. Unión intercelular tipo <i>tight junction</i> entre las células epiteliales de los constructos corneales generados mediante ingeniería tisular.....	92
Figura 45. Presencia de microvellosidades y prolongaciones celulares en el epitelio corneal construido sobre los soportes estromales artificiales.....	93
Figura 46. Imágenes de MEB de una córnea nativa de conejo de laboratorio y de un equivalente corneal construido por ingeniería tisular.....	95
Figura 47. Imagen de MEB en la que se pueden apreciar varios queratocitos inmersos en una malla de fibras de fibrina y agarosa.....	96
Figura 48. Imagen de MET en la que se pueden apreciar varios queratocitos inmersos en una malla de fibras de fibrina y agarosa.....	96
Figura 49. Imagen de MET de un equivalente corneal con sustituto estromal de fibrina y agarosa al 0,1%.....	97
Figura 50. La evaluación de los equivalentes corneales mediante MO demostró la presencia de una monocapa celular de endotelio corneal en su base	98
Figura 51. Análisis inmunohistoquímico de los equivalentes corneales organotípicos.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de constructos elaborados mediante ingeniería tisular.....	35
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo DMEM y HAM-F12 utilizados en este trabajo.....	52

INTRODUCCIÓN

1.- LA CÓRNEA.

1.1. Introducción.

La córnea es una estructura avascular, su cara anterior está en contacto con la lágrima, mientras que la cara posterior está en contacto con el humor acuoso; es a partir de estos dos medios de donde la córnea obtiene sus requerimientos fisiológicos, lo que le permite carecer de vascularización.

La córnea está especializada en llevar a cabo múltiples funciones, por su importancia destacamos la función óptica y la función de barrera frente a agentes externos:

1.1.1. Función óptica.

La córnea es *transparente*, permitiendo la refracción y transmisión de la luz a su través. La enorme regularidad y uniformidad de su estructura, especialmente la ordenación en láminas de las fibras de colágeno del estroma corneal, formando una red tridimensional, el estrecho diámetro de estas fibras (entre 30 y 38 nm), así como la ausencia de vasos sanguíneos, facilita la transparencia de la córnea (Freegard, 1997; Freund *et al.*, 1995; Maurice, 1957). Pero además la córnea tiene una gran capacidad *refractiva*, actuando como una lente convergente. Morfológicamente, la cara anterior de la córnea tiene forma de hemiesfera de 7,7 mm de radio, lo cual, debido a la diferencia entre los índices de refracción del aire (1) y de la córnea (1,376) supone 48,2 dioptrías. La superficie posterior presenta un radio de 6,8 mm lo cual supone un poder dióptrico negativo de 5,9 dioptrías. Esto es debido a que la córnea posterior separa dos elementos con índices de refracción similares, el humor acuoso (1,336) y la propia córnea (1,376). El poder de refracción total de la córnea es, por tanto, de 42 dioptrías [48,8 + (-5,8)], lo cual supone un 70% del poder de refracción total del ojo (Katz, 1989).

1.1.2. *Función de barrera frente a agentes externos.*

La córnea contribuye a la protección de los contenidos intraoculares, en este sentido la córnea es muy resistente a la abrasión y tiene una gran capacidad de regeneración. Para llevar a cabo esta función, la córnea está íntimamente relacionada con los anejos oculares, que representan sistemas protectores y de soporte, sobre todo la conjuntiva, el aparato lagrimal y los párpados (Duran de la Colina, 1998).

1.2. Anatomía e histología de la córnea.

Morfológicamente, la córnea se puede comparar a un casquete de esfera, presentando un diámetro vertical medio de 11,5 mm y un diámetro horizontal medio de 12 mm. El espesor corneal oscila entre 0,49 y 0,56 mm en la zona central, y entre 0,7 y 0,9 mm en la zona periférica. La córnea tiende a incrementar su diámetro y a aplanarse con la edad, alcanzando su medida definitiva después del primer año de vida (Gordon y Donzis, 1985).

Histológicamente, la córnea consta de 5 capas, denominadas, desde el exterior hacia el interior: a) *epitelio*, b) *membrana de Bowman*, c) *estroma*, d) *membrana de Descemet* y e) *endotelio*, según se describe a continuación (figura 1):

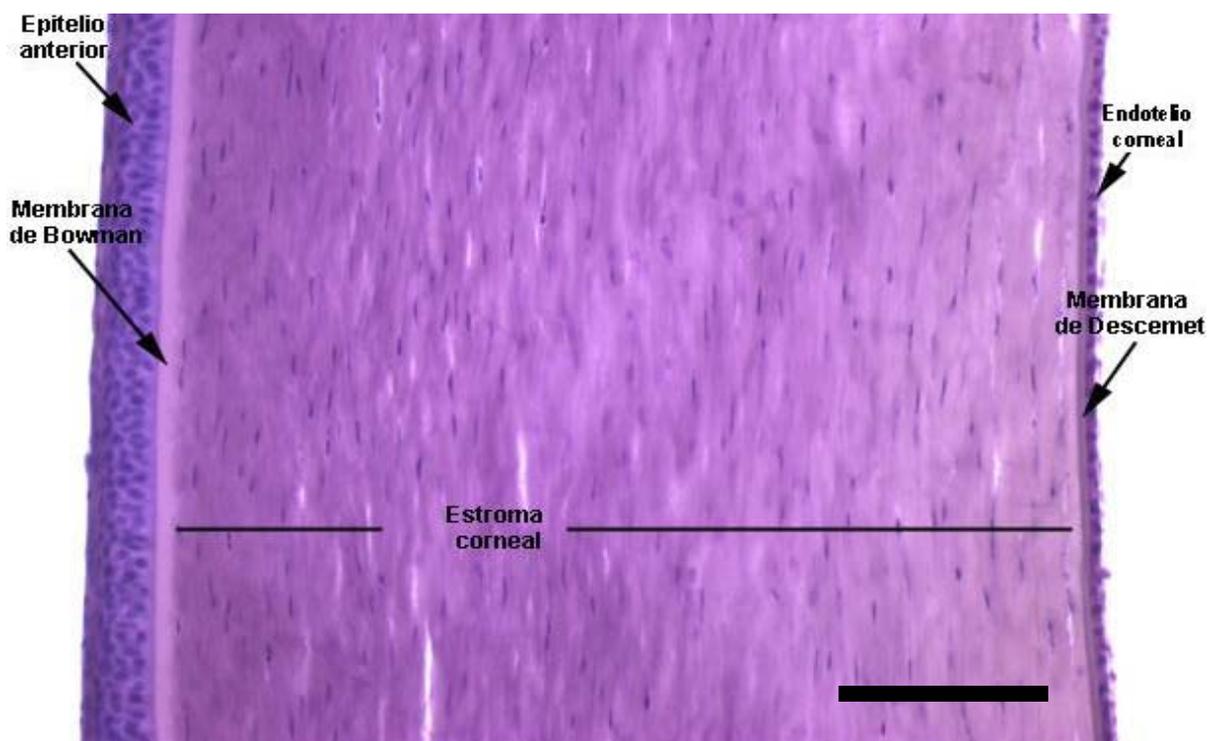
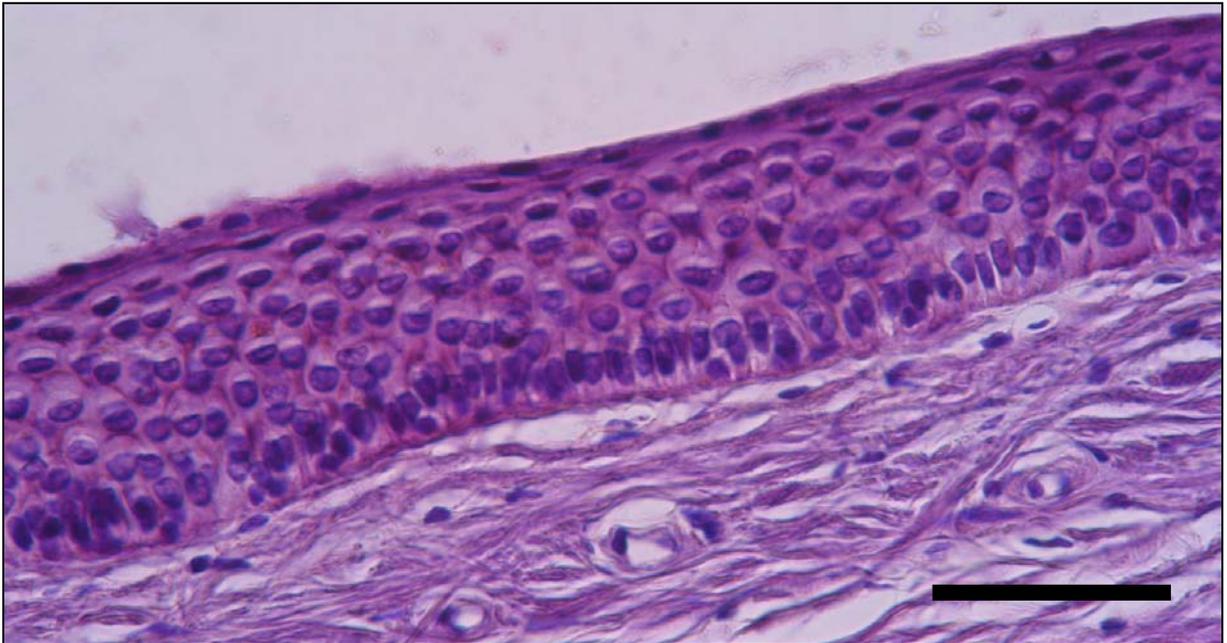


Figura 1. Histología de la córnea humana. Imagen de microscopía óptica que muestra las capas corneales: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Tinción con hematoxilina-eosina. Escala: 250 μ m.

1.2.1. *Epitelio corneal* (figura 2).

La capa más externa de la córnea está constituida por un epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado, cuyo espesor oscila entre 50 y 56 μm . En su zona central tiene entre 5 y 7 capas de células, mientras que en periferia tiene entre 8 y 10 capas.



CÉLULAS SUPERFICIALES
CÉLULAS ALARES
CÉLULAS BASALES
MEMBRANA DE BOWMAN

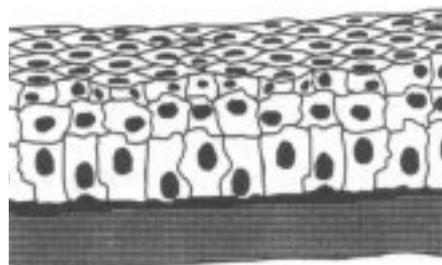


Figura 2. Epitelio corneal. Pueden diferenciarse las distintas capas celulares del epitelio corneal: células superficiales, células alares y células basales. Tinción con hematoxilina-eosina. Escala: 100 μm .

Las dos capas más superficiales del epitelio están formadas por las denominadas células de superficie, escamosas o apicales, que están en contacto directo con la lágrima. Durante el proceso de descamación fisiológica de la córnea, estas células superficiales acaban desprendiéndose a la lágrima, siendo rápidamente sustituidas por células de estratos inferiores. La superficie externa de las células epiteliales apicales está cubierta de pliegues y microvellosidades de entre 0.5 y 1.2 μm cuya función es aumentar la superficie de contacto entre las células y el exterior (Pfister, 1973).

Las capas intermedias del epitelio corneal están constituidas por dos o tres filas de células que poseen prolongaciones en forma de alas, por lo que se denominan células alares. Estas células tienden a aplanarse conforme se acercan a la superficie, siendo sus núcleos paralelos a ésta.

La capa basal está formada por células columnares o basales, perpendiculares a la superficie, que presentan un núcleo prominente en su parte anterior. Las células basales 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 a las células intermedias (Lavker *et al.*, 1991).

Entre las células epiteliales existen numerosas interdigitaciones y uniones intercelulares de tres tipos: a) desmosomas: uniones intercelulares puntiformes que proporcionan una gran estabilidad mecánica al epitelio, formados por proteínas del tipo de las cadherinas que atraviesan la membrana celular, las cuales hacia el exterior celular se unen a cadherinas de otra célula y, por la parte interior (citósol), a filamentos de queratina; los desmosomas son más abundantes en las capas superficiales, aunque se encuentran por todas las capas del epitelio, b) uniones comunicantes (gap junctions): forman canales de iones y moléculas hidrofílicas, para el paso de moléculas de una célula a otra, son más abundantes en las capas

basales aunque se encuentran por todas las capas del epitelio y c) uniones estrechas denominadas zónula occludens (tight junctions), las cuales constituyen una fusión real de las bicapas lipídicas de las membranas celulares adyacentes (Mac Laughlin *et al.*, 1985) y se encuentran sobre todo en las capas superficiales. Las uniones estrechas constituyen un mecanismo muy importante para el mantenimiento de la homeostasis interna de la córnea, ya que impiden el paso de todo tipo de moléculas al espacio intercelular, formando así una barrera entre la córnea y el exterior.

Las células epiteliales expresan queratinas específicas de la córnea, en especial queratina 3 (codificada por el gen KRT3) y queratina 12 (codificada por el gen KRT12) (Moll *et al.*, 1982), las cuales pueden utilizarse como marcadores de diferenciación epitelial corneal.

Entre las células basales podemos encontrar linfocitos y células de Langerhans (estas últimas sobre todo en periferia, lo que explica la buena tolerancia inmunológica del injerto) (Forrester *et al.*, 2002), así como abundantes terminaciones nerviosas.

Las células de la capa basal del epitelio se adhieren a la membrana basal mediante hemidesmosomas, que constituyen complejos de unión muy fuertes entre las células y la membrana basal. A nivel de los hemidesmosomas existe un entramado de fibrillas de colágeno tipo VII (fibrillas de anclaje) que unen estas células a la membrana basal, a la membrana de Bowman y al estroma anterior, donde se fijan mediante placas de colágeno tipo IV, tipo VII y laminina (placas de anclaje) (Gipson *et al.*, 1988).

Bajo el epitelio encontramos una membrana basal (figura 3) de aproximadamente 75 nm de espesor. Junto con los hemidesmosomas y las fibrillas de anclaje, la membrana basal juega un papel importante en la unión del epitelio corneal a la membrana de Bowman. Al microscopio electrónico, la membrana basal

está formada por una zona clara anterior de 25 nm (*lámina lúcida*) y una zona oscura posterior de 50 nm (*lámina densa*).

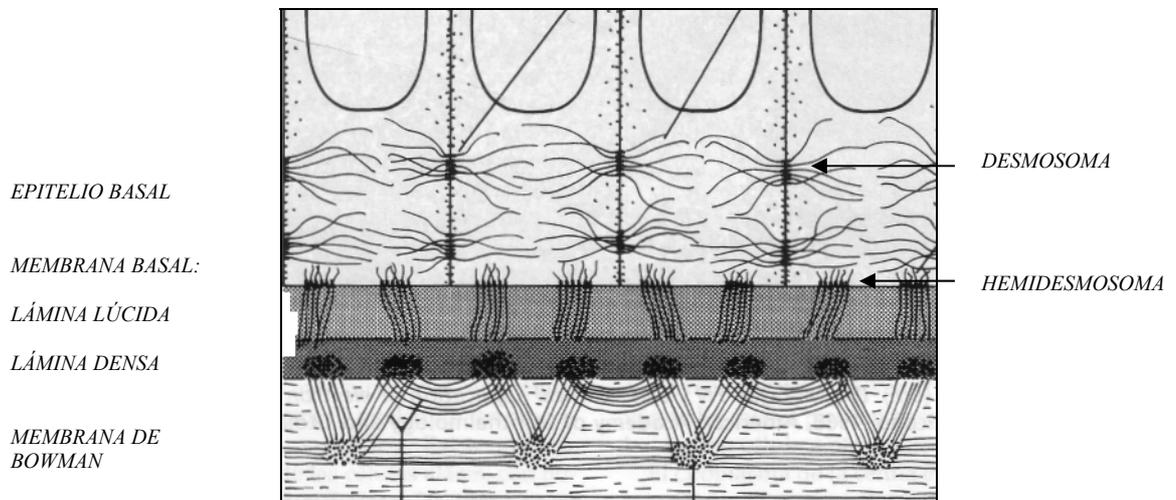


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de adhesión del epitelio corneal a la membrana basal y a la membrana de Bowman.

1.2.2. Membrana de Bowman.

Internamente al epitelio corneal, encontramos una estructura denominada membrana de Bowman. Se trata de una capa acelular de 8 a 12 μm de espesor, compuesta por fibras de colágeno tipo I y tipo III, que está fuertemente anclada al estroma corneal. La membrana de Bowman actúa como una importante barrera física al paso de sustancias desde y hacia el estroma. Debido a la ausencia de células, esta estructura corneal carece de capacidad regeneradora, por lo que cualquier daño a este nivel suele generar una reacción cicatricial.

1.2.3. Estroma corneal.

Con un espesor de 0,5-0,54 mm en la zona central, y 0,7 mm en la periferia, el estroma constituye el 90% del espesor corneal total

Histológicamente, el estroma corneal está formado por una matriz extracelular (constituida principalmente por colágeno tipo I y proteoglicanos) en la cual se localizan las células estromales denominadas queratocitos (figura 4).

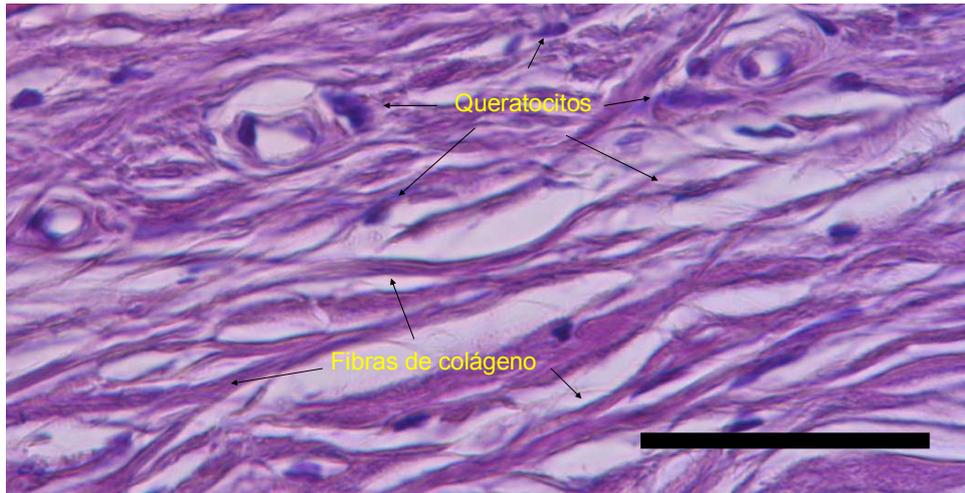


Figura 4. Estroma corneal. Imagen microscópica de la córnea, en la que se aprecian queratocitos y fibras de colágeno. Tinción con hematoxilina-eosina. Escala: 100 μ m.

1.2.3.1. Matriz extracelular del estroma corneal.

a) Componente fibrilar. La matriz extracelular está formada por una red tridimensional de fibras de colágeno cuya orientación es fundamental a la hora de permitir la correcta refracción de la luz hacia la retina, así como la resistencia mecánica de toda la estructura corneal. En su mayor parte, se trata de fibras de colágeno tipo I (más del 98% del total), y colágeno tipo V (menos del 2%). Estas fibras se disponen tridimensionalmente para formar entre 200 y 250 láminas paralelas. Dentro de cada lámina, todas las fibras tienen la misma dirección, aunque la orientación entre una y otra lámina es oblicua (figura 5). Esta disposición permite que el estroma sea transparente, dispersando menos del 10% de la luz que incide sobre él (Freegard, 1997; Freund *et al.*, 1995; Maurice, 1957).

b) Proteoglicanos. El estroma corneal es muy rico en este tipo de componentes, especialmente condroitín-sulfato y queratán sulfato. Los proteoglicanos corneales tienen una gran capacidad para atraer agua y cationes, lo cual hace que el estroma corneal tienda a edematizarse absorbiendo agua desde la cámara anterior. La bomba metabólica del endotelio y en menor medida la del

epitelio, evitan la edematización del estroma. La distribución de proteínas en la córnea no es uniforme, por lo que la cantidad de agua es menor en la región anterior que en la posterior (Castoro *et al.*, 1998).

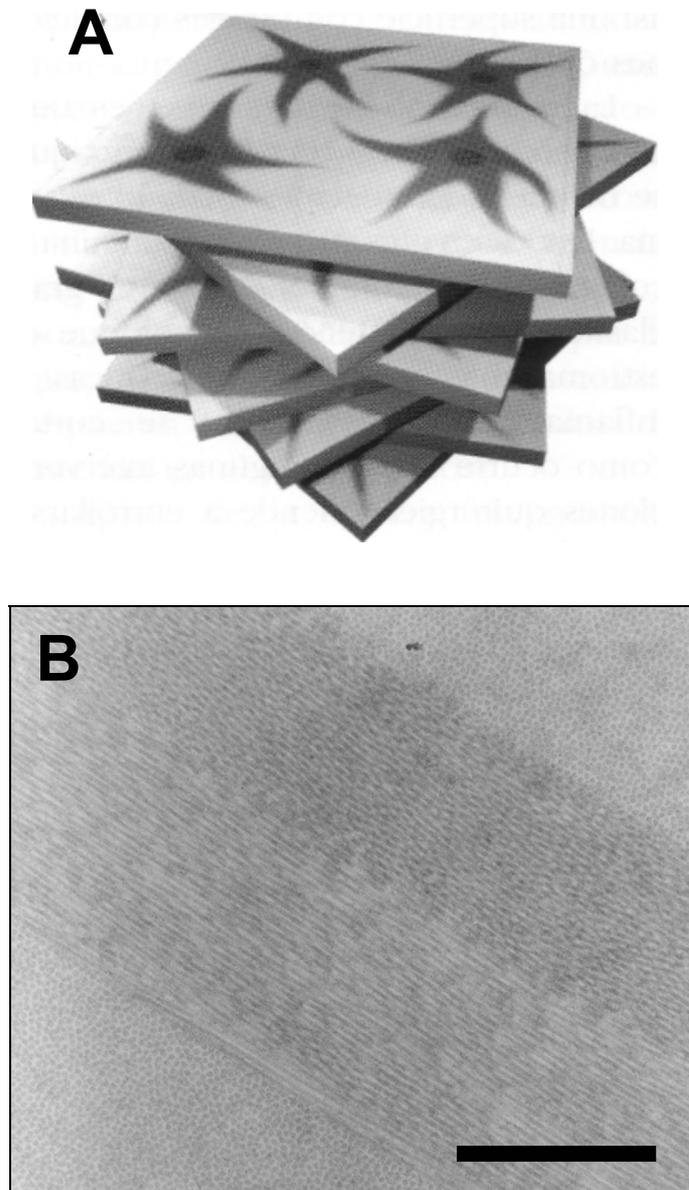


Figura 5. Disposición de las capas de colágeno en el estroma corneal.
A: Representación de la disposición de las capas de colágeno. Para mantener la transparencia de la córnea, las distintas capas de fibras se disponen formando una red tridimensional, en la que cada lámina es capaz de corregir los defectos de refracción generados por las láminas anteriores. B: Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra la disposición de las láminas y de las fibras de colágeno. Escala: 20 μm

1.2.3.2. Componente celular del estroma corneal:

a) Queratocitos (figura 6). Estas células son fibroblastos especializados que se encuentran entre las láminas del estroma y juegan un papel importante en la síntesis de proteoglicanos y colágeno. Los queratocitos son células grandes y planas, con prolongaciones que le confieren una forma estrellada. Ante una lesión los queratocitos migran a la zona dañada y tratan de repararla (Robb *et al.*, 1962).

b) Polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. Estas células son poco abundantes en el estroma, y proceden de vasos sanguíneos periféricos a la córnea, en caso de inflamación, su número aumenta de forma importante.

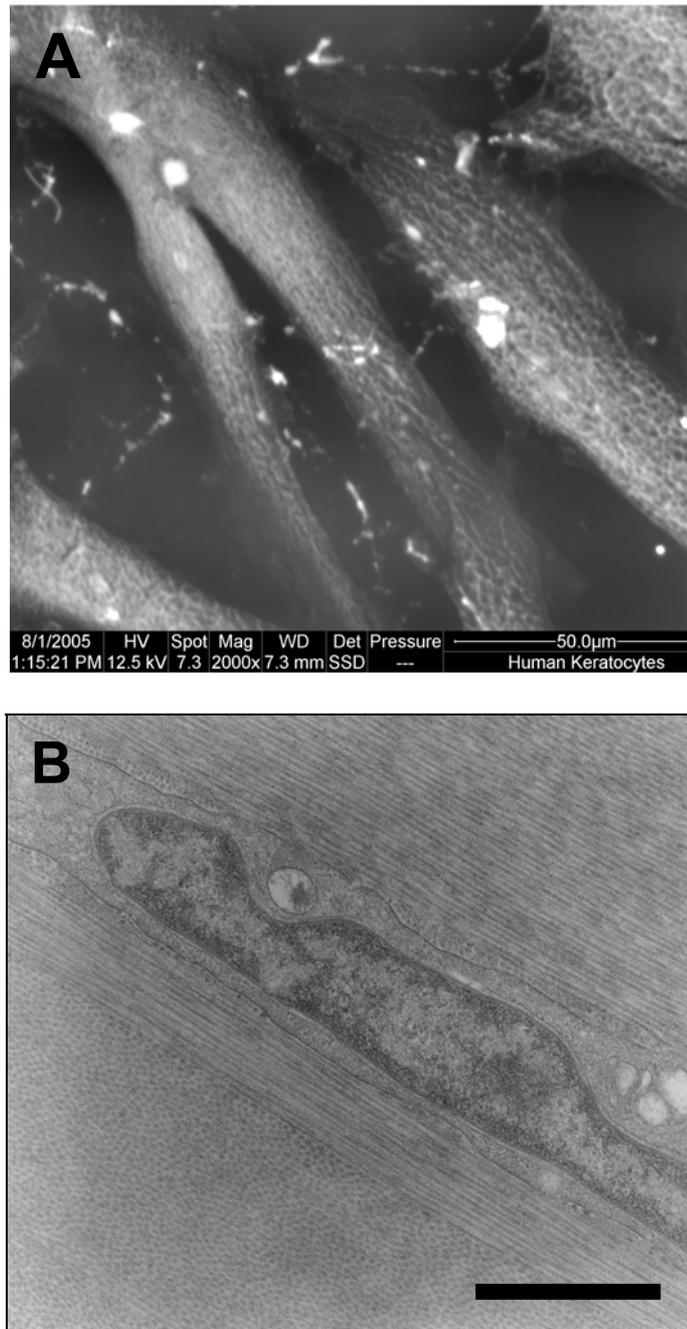


Figura 6. Queratocitos estromales. A: Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se muestran varias células estromales humanas mantenidas en cultivo. Escala: 50 μm . B: Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra una célula corneal estromal humana, situada entre varias fibras de colágeno del estroma corneal. Escala: 20 μm .

1.2.4. *Membrana de Descemet.*

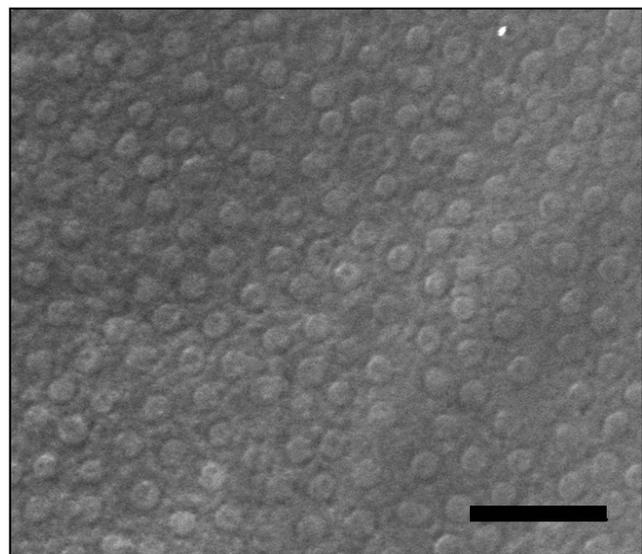
Esta estructura, que separa el estroma del endotelio corneal, es en realidad una membrana basal producida fundamentalmente por el endotelio. Con un espesor de entre 10 y 15 μm , la membrana de Descemet se mantiene unida de forma muy tenue al endotelio corneal, alcanzando el ángulo esclerocorneal en la llamada *línea de Schwalbe*. Al microscopio electrónico, la membrana de Descemet aparece como un enrejado de fibrillas de colágeno tipo IV, laminina y fibronectina (Newsome, 1981), y consta de una zona estriada anterior (que se desarrolla durante la vida intrauterina), y una zona no estriada posterior (que se establece a lo largo de la vida). En su conjunto, la membrana de Descemet es una estructura muy elástica, capaz de regenerarse con rapidez y muy resistente a la acción de enzimas proteolíticos. Por este motivo, en úlceras corneales graves, la membrana de Descemet resiste formando un *descematocele*.

1.2.5. *Endotelio corneal* (Figura 7).

El endotelio corneal constituye la capa más interna de la córnea, en contacto directo con la cámara anterior del ojo y, por lo tanto, con el humor acuoso. Es en realidad una capa de mesotelio, aunque tradicionalmente se le ha llamado endotelio por estar en contacto con un líquido (el humor acuoso) por similitud al endotelio vascular en contacto con otro líquido (la sangre).

Histológicamente, el endotelio corneal está constituido por una monocapa de células planas hexagonales que se imbrican unas con otras para formar un mosaico. Las uniones de las células endoteliales a la membrana de Descemet son muy tenues lo cual les permite desplegarse para cubrir toda la superficie posterior de la córnea (Waring *et al.*, 1974). Entre las células, existen numerosas uniones herméticas tipo *mácula ocludens* (menos fuertes que las *zónula ocludens* del epitelio, por lo que la barrera endotelial no es tan eficaz como la epitelial) (Mac Laughlin *et al.*, 1985) así como uniones comunicantes.

Figura 7. Endotelio corneal. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la córnea humana en la que se aprecian las células endoteliales recubriendo toda la superficie interna de la córnea. Escala: 50 μm .



El núcleo de estas células es grande, mientras que en el citoplasma hay una importante actividad de síntesis mitocondrial de ATP, así como de ATPasas. Todo ello está relacionado con el elevado metabolismo basal que presentan las células

endoteliales, el cual permite a éstas llevar a cabo una importante función de control de los niveles de hidratación del estroma corneal.

Tradicionalmente, se pensaba que estas células endoteliales corneales no tenían capacidad de regeneración en el ser humano, no existiendo mitosis tras el nacimiento. De este modo, habría una disminución progresiva del número de células endoteliales con la edad, por lo que las células remanentes aumentarían su tamaño para cubrir todo el espacio corneal. Distintos investigadores han demostrado que el endotelio corneal humano, como el resto de los tejidos del organismo, posee cierto número de células madre indiferenciadas y, por lo tanto, es capaz de proliferar y regenerarse en el adulto, aunque en un grado muy bajo (Joyce, 2003). La densidad celular en el adulto joven es de unas 3.000-3.500 células por mm^2 de superficie corneal. La existencia de un número de células inferior a 500-700 células por mm^2 puede asociarse a una pérdida de función endotelial.

1.3. Fisiología de la córnea.

1.3.1. Nutrición corneal.

La córnea es una estructura avascular, por lo que sus requerimientos fisiológicos los obtiene de la lagrime (vía lagrimal) y del humor acuoso (vía humoral). Todas las regiones de la córnea obtienen O₂ desde la lágrima, y eliminan el CO₂ mediante difusión simple a la atmósfera a través del epitelio. Otros nutrientes como la glucosa o los aminoácidos, se obtienen del humor acuoso a través del endotelio corneal. Distintos factores de crecimiento que la córnea requiere utilizan las dos vías (lagrimal y humoral), mientras que el lactato corneal se elimina por el endotelio hacia la cámara anterior. Por otro lado, es probable que las áreas más periféricas de la córnea reciban aportes nutricionales procedentes de los vasos límbicos cercanos.

1.3.2. Mantenimiento del epitelio corneal.

El epitelio corneal se renueva cada 7 días (Hanna *et al.*, 1961) a partir de las *células madre* que se encuentran en el limbo esclerocorneal (Tseng, 1989). La hipótesis más aceptada es la del movimiento celular X,Y,Z (figura 8) (Thoft y Friend, 1983), según la cual, las células madre limbares tienen un desplazamiento horizontal centrípeto (Y) y se diferencian a células amplificadoras transitorias. Posteriormente estas células alcanzan la capa basal del epitelio, donde proliferan y se desplazan verticalmente (X), diferenciándose hacia células postmitóticas suprabasales o alares. Éstas últimas se diferencian hacia células superficiales que acaban descamándose a la lagrime (Z) (Lehrer *et al.*, 1998).

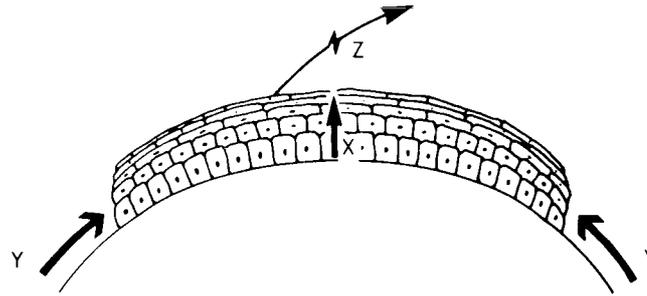


Figura 8. Hipótesis del movimiento celular ($X+Y=Z$). Las células madre del epitelio corneal localizadas a nivel del limbo esclerocorneal migran hacia el ecuador corneal (y) para desplazarse verticalmente (x) y descamarse a la lágrima (z).

1.3.3. Respuesta ante las heridas corneales:

- Lesión epitelial: como respuesta a una erosión del epitelio corneal, se produce una liberación reactiva de citoquinas que provoca una reacción en 3 fases:

a) fase latente (4-6 horas de duración): se eliminan los restos celulares, se interrumpen las mitosis y se reducen los hemidesmosomas de unión a la membrana basal en la zona afectada (Dua *et al.*, 1994), b) fase de migración celular (24-36 horas de duración): las células epiteliales aumentan de tamaño y mediante movimientos ameboides tienden a cubrir el defecto tisular (Cintrón *et al.*, 1982). De este modo, se consigue reestablecer el efecto barrera gracias al aumento de la superficie celular y a la formación de fibrillas y filamentos, incluyendo la fibronectina, c) fase de proliferación celular: tras el cierre de la herida, se reactivan las mitosis, se activan las células madre limbares, se desarrollan las uniones a la membrana basal y se reestablecen las terminaciones nerviosas (Crosson *et al.*, 1986). Para la correcta recuperación del epitelio, es necesaria la presencia de células madre limbares así como de una membrana basal íntegra.

- Lesión de la membrana de Bowman: la membrana de Bowman carece de capacidad regeneradora, por ello, durante la curación de la herida corneal se suele formar una delgada capa secundaria con una estructura similar a la membrana de

Bowman, pero nunca recupera el grosor inicial. El resultado de este proceso cicatricial anómalo suele ser la aparición de zonas corneales no transparentes denominadas leucomas.

- Lesión estromal: cuando una herida corneal profunda afecta al estroma de la córnea, se produce localmente una liberación de citoquinas, la cual provoca en pocas horas un desplazamiento de polimorfonucleares de la sangre hacia la zona lesionada. A continuación se produce un acúmulo de fibroblastos y miofibroblastos en la zona, y los queratocitos migran hacia los márgenes de la herida para formar un sincitio. Finalmente estas células experimentan un proceso de hipertrofia y proliferación que trata de incrementar la producción de colágeno y mucopolisacaridos para compensar la pérdida de sustancia (Davidson y Galbavy, 1986). Sin embargo, esta pérdida de especialización de los queratocitos les lleva a liberar sustancias comunes a cualquier herida, generándose un aumento del tamaño y una disposición irregular de las fibras de colágeno, disminuyendo así la resistencia y la transparencia de la córnea. Posteriormente, la herida sufre una remodelación gradual para favorecer el reestablecimiento de la resistencia a la tensión, la cual aumenta gradualmente hasta el cuarto año tras la agresión corneal (Gosset y Dohlman, 1968).

- Lesión endotelial: en ocasiones, un traumatismo quirúrgico, una enfermedad o simplemente la edad, pueden provocar una pérdida de células endoteliales. En estos casos, el endotelio responde con una fase de expansión y migración de las células adyacentes para cubrir el defecto tisular (Matsuda *et al.*, 1985), produciéndose dos fenómenos: polimegatismo (algunas células aumentan de tamaño, provocando un aumento del coeficiente de variación del tamaño celular) y pleomorfismo (variación en la forma celular, con aumento del número de células que pierden su forma hexagonal). Al recuperar la monocapa confluyente, se restablecen las funciones de barrera y bomba metabólica del endotelio corneal.

1.3.4. *Inervación de la córnea.*

La inervación de la cornea proviene de la rama oftálmica del ganglio trigémino, que alcanza la córnea a través de los nervios nasociliares largos. Estos nervios penetran en el estroma corneal a nivel del limbo esclerocorneal, mediante 10 ó 12 troncos nerviosos que forman el plexo nervioso subepitelial. Este plexo está formado por ramificaciones horizontales muy numerosas, existiendo una terminación nerviosa por cada 1,5 células epiteliales basales (Rozsa y Beuerman, 1982), así como ramificaciones verticales hacia la superficie epitelial. Todo ello hace que exista una red densa de receptores sensitivos especializados que alcanza las capas superficiales del epitelio corneal (Assouline, 1993), por lo que se considera que la córnea es el tejido con más inervación de todo el organismo. Estas fibras nerviosas son de tipo sensitivo-nociceptivo, de velocidad de conducción lenta (Beuerman *et al.*, 1980), aunque también se encuentran fibras simpáticas procedentes del ganglio cervical superior. Estas últimas fibras suelen alcanzar el limbo esclerocorneal asociadas a vasos sanguíneos, llegando algunos axones a nivel epitelial y subepitelial corneal (Assouline, 1993).

1.4. Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio.

Macroscópicamente, la córnea del conejo de laboratorio (*oryctolagus cuniculus*) es más delgada que la humana. Su espesor aproximado es de 0,30 mm en el centro y de 0,40 mm en periferia, mientras que la córnea humana presenta un espesor central entre 0,49 y 0,56 mm, que aumenta hasta 0,7-0,9 mm en la periferia.

Histológicamente, la córnea del conejo presenta dos diferencias importantes respecto a la córnea humana: en primer lugar, carece de membrana de Bowman (figura 9), lo cual contribuye a su menor espesor; en segundo lugar, el endotelio corneal de conejo muestra una gran tendencia a la mitosis (Muñoz *et al.*, 1990) (Thomas, 1964), por lo que estas células, a diferencia de las humanas, tienden a proliferar activamente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Respecto al limbo esclerocorneal, mientras en el ser humano existe una zona gris que separa la córnea (que es transparente) de la esclera (que es blanca), en el conejo no existe esta zona pasando bruscamente de córnea a esclera, por lo que el limbo esclerocorneal es más delgado.

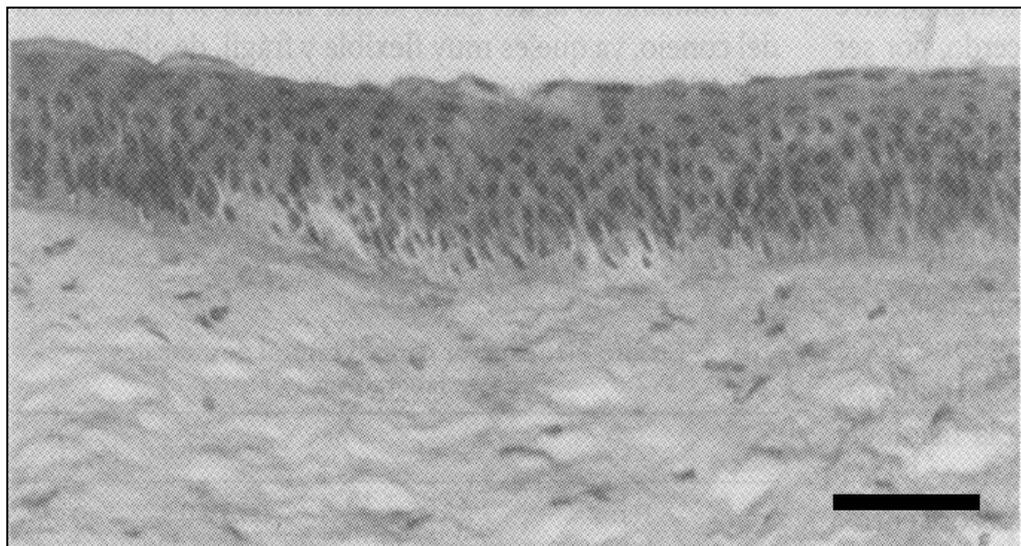
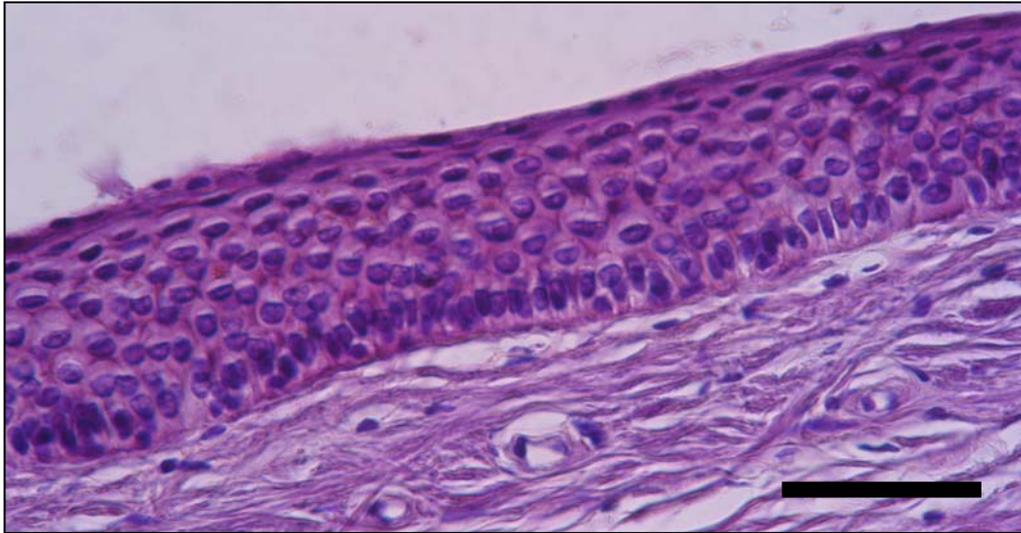


Figura 9. Anatomía comparada de la córnea humana y del conejo de laboratorio.

A: Microfotografía del epitelio corneal humano teñido con hematoxilina-eosina. Se observa una membrana de Bowman conspicua que separa el epitelio del estroma corneal. Escala: 100 μm .

B: Epitelio corneal del conejo de laboratorio. En los mamíferos, exceptuando a los primates, el epitelio no está separado del estroma corneal por una membrana de Bowman. Escala: 100 μm .

1.5. Patología corneal severa y su tratamiento quirúrgico.

Aunque la mayor parte de las patologías que afectan a la córnea son susceptibles de tratamiento médico, numerosas afecciones graves de la córnea requieren la sustitución de la córnea dañada. Para ello existen tres técnicas principales:

1.5.1. Queratoplastia penetrante (figura 10).

Consiste en la implantación de un segmento corneal de espesor completo, que proviene de un donante cadáver (aloinjerto). Actualmente es la técnica más utilizada, y suele arrojar buenos resultados; sin embargo, la existencia de problemas como la escasez de donantes, el rechazo del injerto (figura 11), y la transmisión de enfermedades al receptor, obligan a la búsqueda de otras alternativas terapéuticas.

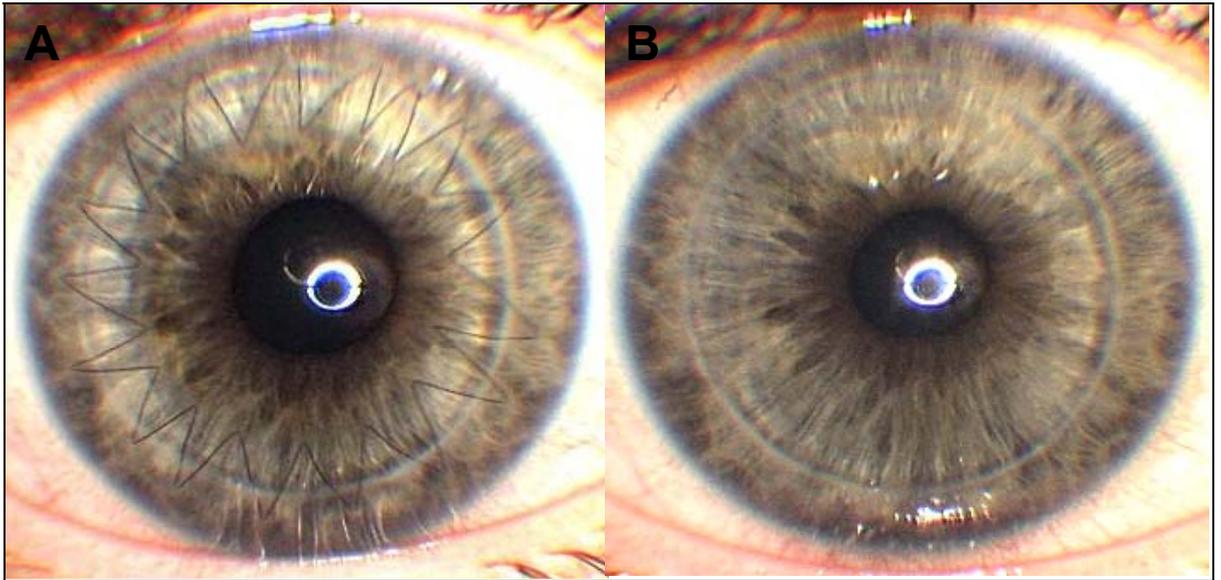


Figura 10. Aspecto clínico de una córnea transplantada. A: aspecto a los tres meses de la intervención quirúrgica, puede observarse la sutura continua. B: aspecto al año de la intervención quirúrgica, el material de sutura ya ha sido retirado.

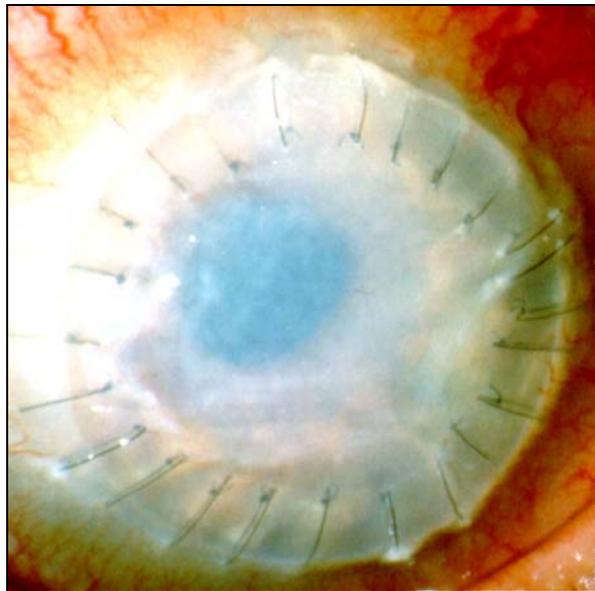


Figura 11. Rechazo del injerto corneal alogénico. Edema corneal irreversible provocado por una reacción inmune contra los aloantígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de las células del injerto.

Dependiendo de las indicaciones susceptibles de queratoplastia penetrante, ésta se puede clasificar del siguiente modo:

- a) Queratoplastia óptica. Representa el 90% de las queratoplastias, su objetivo es mejorar la agudeza visual. Sus principales indicaciones son: queratopatía bullosa afáquica o pseudofáquica, opacidades corneales tras queratitis infecciosa, traumatismos, fallos del injerto, distrofias corneales estromales y endoteliales, degeneraciones corneales y opacidades corneales congénitas (Hyman *et al.*, 1992). En países desarrollados, las principales indicaciones son: el queratocono, la queratopatía bullosa pseudofáquica y la distrofia de Fuchs; por el contrario, en países subdesarrollados, las principales indicaciones son los leucomas secundarios a queratitis infecciosas, traumatismos y malnutrición crónica (Patel *et al.*, 2000).
- b) Queratoplastia tectónica o reconstructiva: su objetivo es restaurar la estructura corneal. Sus principales indicaciones son: perforación o adelgazamiento corneal, queratocono, queratoglobo, degeneración marginal pelúcida y traumatismos.
- c) Queratoplastia terapéutica: indicada en queratitis infecciosas que no responden a tratamiento médico, para eliminar el foco infeccioso.
- d) Queratoplastia cosmética: su objetivo es restaurar la apariencia normal en un ojo amaurótico de aspecto antiestético.

1.5.2. *Queratoplastia lamelar.*

En este tipo de intervención, se reemplaza únicamente el tejido corneal dañado por tejido corneal de donante cadáver, dejando intacto el tejido sano (Barraquer, 1972). Las técnicas principales son:

- a) Queratoplastia lamelar anterior, en la cual se sustituye el tejido corneal anterior, y que puede ser: a.1) superficial, si sustituye solamente el tejido estromal anterior (Hafezi *et al.*, 2003). Esta técnica está indicada en trastornos corneales que afecten a las 300 μm superficiales de la córnea, sobre todo en complicaciones de cirugía refractiva, leucomas y distrofias corneales anteriores, y b) profunda, si sustituye todo el tejido estromal respetando la membrana de Descemet y el endotelio (Melles *et al.*, 1999). Indicada principalmente en los trastornos corneales con un endotelio sano, como queratoconos, distrofias estromales o leucomas profundos.
- b) Queratoplastia lamelar posterior (Melles *et al.*, 2000; Terry *et al.*, 2003), en la cual se sustituye el tejido corneal posterior incluyendo el endotelio. Esta técnica está indicada principalmente en los trastornos corneales en los que existe un fracaso endotelial.

1.5.3. Queratoprótesis.

Consiste en la implantación de sustitutos corneales artificiales no biológicos. Se suelen indicar en casos con mala respuesta a la queratoplastia penetrante, como rechazos repetidos del injerto, o déficit bilateral de células madre limbares (Yagouti *et al.*, 2001). Su principal problema consiste en la imposibilidad de las células epiteliales corneales del receptor para colonizar y adherirse a la prótesis, por lo que estos implantes son totalmente inertes.

2. EL LIMBO ESCLEROCORNEAL

2.1. Introducción.

El limbo esclerocorneal es una zona de transición entre la córnea y la esclerótica, así como el epitelio limbar es una zona de transición entre el epitelio conjuntival y el epitelio corneal. Aunque su tamaño es muy reducido, esta estructura juega un papel fundamental en la fisiología del polo anterior del globo ocular, motivo por el cual dedicamos un capítulo a su estudio.

Las funciones del limbo esclerocorneal son múltiples, destacando las siguientes: nutrición de la córnea periférica, cicatrización corneal, regeneración del epitelio corneal, inmunovigilancia y respuestas de hipersensibilidad y función de barrera, impidiendo que el tejido conectivo escleral y conjuntival alcance la córnea (Forrester *et al.*, 2002). Probablemente, la más importante de esas funciones es la de actuar como reservorio de células madre del epitelio corneal y, por tanto, permitir la regeneración y mantenimiento de este epitelio (figura 12).

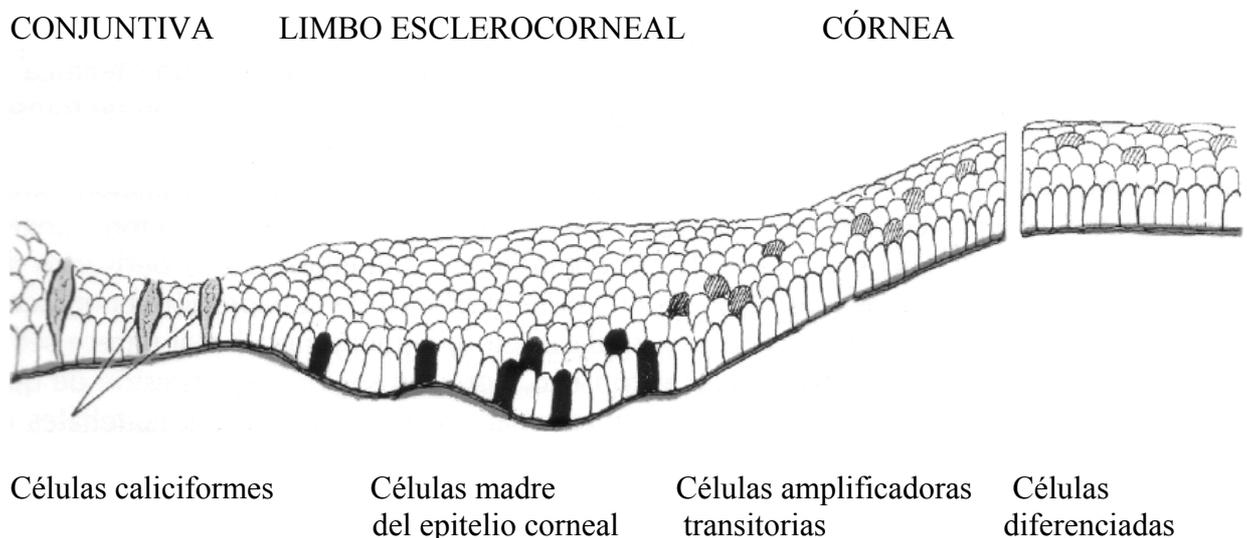


Figura 12. Representación esquemática del epitelio del limbo esclerocorneal. Al constituir una zona de transición entre la córnea y la conjuntiva, el epitelio limbar presenta características intermedias entre ambas estructuras.

2.2. Anatomía e histología del limbo esclerocorneal.

Macroscópicamente, el limbo esclerocorneal humano se distingue como una línea grisácea de unos 2 mm de anchura que separa la córnea (que es transparente) de la esclera (blanquecina).

Microscópicamente, el epitelio del limbo esclerocorneal es la zona que separa el epitelio columnar conjuntival del epitelio escamoso estratificado de la córnea. El epitelio limbar consta de más de 10 capas celulares, mientras que el corneal consta de 5-8 capas y el conjuntival consta de 1-2 capas (figura 12). La membrana de Bowman por su parte, termina en un extremo redondeado en el margen central del limbo, en los ápices de los vasos sanguíneos limbares. 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. Por otro lado, las características genéticas del epitelio limbar son intermedias entre las de los epitelios corneal y conjuntival (Kinoshita *et al.*, 1983).

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*" (Davanger y Evensen, 1971; Goldberg *et al.*, 1982) en las cuales se origina el epitelio corneal. Las células basales de estas estructuras son células madre de diferenciación epitelial (Tseng, 1989) que están fuertemente unidas a la membrana basal (Dua *et al.*, 2000). Estas células madre poseen una alta actividad mitótica, y no expresan queratina 3 (Schermer *et al.*, 1986), ni queratina 12 (Chen *et al.*, 1994). Como todas las células madre, estas células basales poseen la capacidad de división celular asimétrica, es decir, en la mitosis se produce una célula destinada a la regeneración de la reserva de células madre, mientras que la otra célula se diferencia hacia una célula amplificadora transitoria destinada a regenerar el epitelio corneal.

En el limbo esclerocorneal también existen otros tipos celulares como las células de Langerhans, fibroblastos, mastocitos y melanocitos, que cumplen funciones muy diversas.

Por otra parte, la lámina basal del limbo esclerocorneal es rica en colágeno tipo IV.

2.3. Patología del limbo esclerocorneal y su tratamiento quirúrgico.

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 cornea. En concreto, el déficit de células madre limbares produce: a) una inadecuada regeneración del epitelio corneal, provocando defectos epiteliales persistentes, b) un fracaso de la barrera corneal, que se asocia a una con invasión de la córnea por parte del epitelio conjuntival. Este epitelio conjuntival se suele transformar en un epitelio corneal de mala calidad, más fino y con células caliciformes (Figura 13), mediante un proceso conocido como conjuntivalización (Huang y Tseng, 1991). Habitualmente, la conjuntivalización se acompaña de neovascularización superficial, destrucción de la membrana basal (lo cual favorece la cicatrización estromal) e inflamación crónica con alteración de la transparencia corneal (Kruse, 1994).

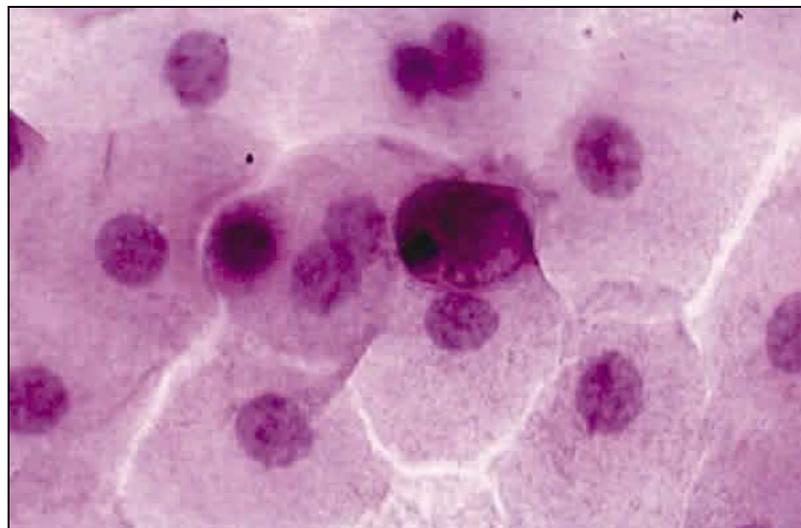


Figura 13. Citología de la córnea de un paciente con insuficiencia limbal grave. Se puede observar la presencia de una célula caliciforme, entre las células no secretoras del epitelio corneal. Tinción con hematoxilina-eosina.

2.3.1. *Clasificación del déficit de células madre limbares.*

Las causas, según su origen pueden agruparse en primarias o secundarias (Rodríguez y Touriño, 2004):

a) Alteraciones limbares primarias: aniridia, deficiencia endocrina múltiple, displasias ectodérmicas, insuficiencia limbar idiopática, neoplasias límbicas, *pterigiones* y queratitis neurotróficas.

b) Alteraciones secundarias a: quemaduras térmicas o químicas, traumatismos o cirugías con abordaje límbico, limbitis crónicas (asociadas a enfermedades del colágeno o úlcera de Mooren), inflamaciones crónicas (penfigoide ocular cicatricial, eritema multiforme o síndrome de Stevens-Johnson, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis límbica superior, rosácea ocular, déficit de vitamina A), crioterapia, radioterapia, queratitis infecciosas o anoxia por uso prolongado de lentes de contacto.

Todas estas patologías hacen que las células madre del limbo esclerocorneal sean escasas y, por tanto, no puedan ejercer su función de mantenimiento del epitelio corneal.

2.3.2. *Técnicas quirúrgicas.*

Hasta la fecha, se han descrito numerosos procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de la patología del limbo esclerocorneal. Los más importantes son los siguientes:

2.3.2.1. Autotransplante de limbo autólogo (figura 14A).

Consiste en la implantación en el ojo enfermo de dos injertos de limbo esclerocorneal extraídos del ojo contralateral sano. Este procedimiento está indicado en insuficiencias límbicas unilaterales en las que se conserva la integridad del ojo adelfo (Kenion, 1989).

2.3.2.2. Transplante de limbo alogénico.

Consiste en el injerto quirúrgico de limbo no propio, procedente de un donante cadáver. Está indicado en pacientes con insuficiencia límbica bilateral, aunque suele fracasar a largo plazo (Henderson, 2001).

2.3.2.3. Transplante de membrana amniótica (figura 14B).

Indicado en insuficiencias límbicas parciales, asociado a autotransplante de limbo, transplante de limbo alogénico, o aisladamente. La membrana amniótica ayuda a reestablecer el estroma limbar no inflamado, aunque carece de células madre (Shimazaki, 1997).

2.3.2.4. Expansión de células madre autólogas, *ex vivo*.

Indicado en insuficiencias límbicas unilaterales. Mediante este procedimiento, las células madre cultivadas a partir de una biopsia del limbo esclerocorneal contralateral, son implantadas en el ojo enfermo mediante membrana amniótica o lentillas de colágeno (Kim *et al.*, 2005; Koizumi *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004). Recientemente, se ha propuesto la utilización de células madre y epitelio de mucosa oral autóloga, especialmente en casos de insuficiencia límbica bilateral (Nishida *et al.*, 2004).

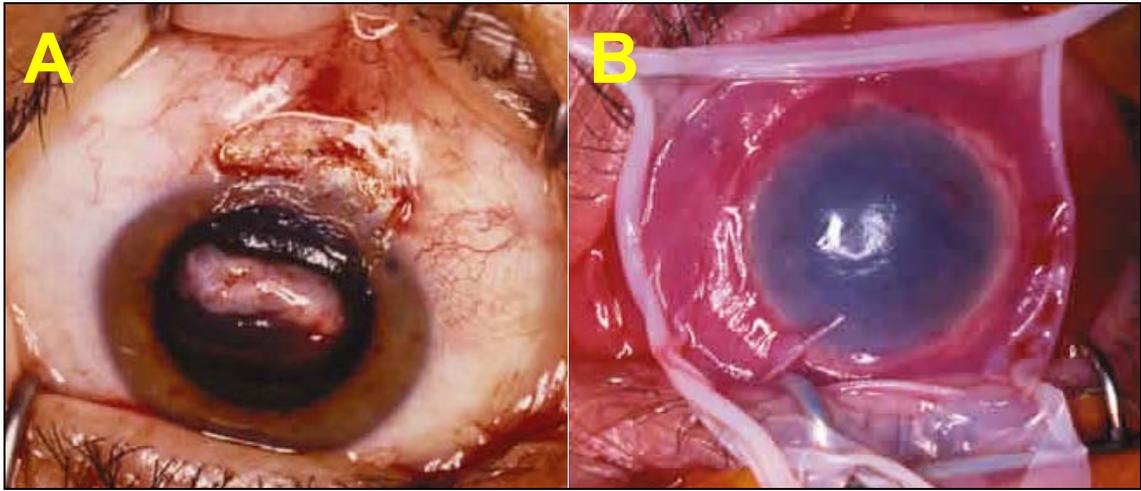


Figura 14. Técnicas quirúrgicas utilizadas en el tratamiento de la patología límbica grave. A: Transplante de limbo esclerocorneal autólogo. B: Transplante de membrana amniótica.

3. LA INGENIERÍA TISULAR.

3.1. Conceptos generales de ingeniería tisular.

La ingeniería tisular es una nueva área de la biotecnología cuyo objetivo es la fabricación de equivalentes tisulares orgánicos que puedan ser utilizados para la sustitución de tejidos y órganos dañados (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Sambanis, 1995).

El rápido desarrollo que ha experimentado esta disciplina durante los últimos años se justifica por dos factores de gran importancia:

a) Las listas de espera en la cirugía de trasplantes, así como la escasez de donantes.

b) La utilización de prótesis autólogas permite eliminar el riesgo de rechazo del injerto así como la utilización de inmunosupresores tras su implantación (Sher *et al.*, 1983).

La fabricación de sustitutos o prótesis biológicas mediante ingeniería tisular se basa en tres pilares: a) células cultivadas a partir de células madre, b) matrices sobre la que se desarrollen estas células: geles, fibras o membranas, c) factores de crecimiento y de diferenciación (Bell, 1995).

Asimismo, para crear una prótesis biológica que se pueda implantar con éxito, son necesarios tres factores:

3.1.1. Tecnología celular:

a.1 Fuentes celulares. Lo primero que necesitamos para fabricar un equivalente tisular es una adecuada fuente de células viables que nos permita elaborar los órganos deseados. Estas células deben tener una adecuada capacidad de proliferación, y además estar libres de patógenos y de contaminación.

Los tres tipos de fuentes celulares que se pueden utilizar en ingeniería tisular son:

- Células autólogas: proceden del propio paciente y no producen respuesta inmunológica.
- Células alogénicas o heterólogas: pertenecen a otro individuo de la misma especie, por lo que producen respuesta inmunológica en el huesped.
- Células xenólogas o xenogénicas: proceden de un individuo de otra especie, por lo que producen respuestas agudas o hiperagudas inmunológica y obligan a descartar la transmisión de virus animales al huesped.

a.2 Función celular: una vez obtenidas las células, debemos manipularlas para obtener las características funcionales deseadas. Esto se puede conseguir mediante manipulación del medio extracelular o por manipulación genética de las células.

a.3 Tecnología de células madre: las células madre son la principal fuente de células para la ingeniería tisular y la terapia regenerativa (Solter, Gearhart, 1999). Las células madre humanas aisladas pueden ser de varios tipos. Atendiendo a su origen, las células madre se clasifican en *embrionarias* (aisladas a partir de la masa celular interna de embriones humanos en fase de blastocisto) y *adultas* (aisladas a partir de células indiferenciadas de tejidos adultos). Atendiendo a su potencialidad, las células madre pueden ser *totipotenciales*, *multipotenciales*, *pluripotenciales* o *unipotenciales*. Las células *totipotenciales* son aquéllas que son capaces de generar cualquier tipo de tejido e incluso un organismo completo. Por otro lado, aquellas células destinadas a la generación de cualquier tipo de tejido, pero no de un organismo completo, se denominan *pluripotenciales*, mientras que las células *multipotenciales* ya están dirigidas hacia un tipo de tejido específico (por ej. la médula ósea). Finalmente, las células *unipotenciales* sólo pueden diferenciarse hacia un tipo específico de células. La mayoría de las células madre

adultas son *unipotenciales* o *multipotenciales*, mientras que las *totipotenciales* y las *pluripotenciales* son de origen embrionario.

Para obtener el máximo potencial de las células madre, debemos comprender cómo una célula madre se diferencia en una célula específica. Esto incluye conocer las vías moleculares de diferenciación, y la identificación de los factores que conducen a la célula madre a diferenciarse hacia un tipo específico de célula. Así podremos, por ejemplo, canalizar una célula madre hacia endotelio corneal.

3.1.2. *Tecnología de constructos:*

Una vez seleccionada una fuente útil de células, el siguiente paso es desarrollar un modelo tridimensional (*constructo*), en el cual esas células se organicen en una arquitectura espacial, con características funcionales similares a las del tejido que queremos sustituir. Las diferentes posibilidades son, fundamentalmente, las matrices celulares, los constructos con células cultivadas y los automontajes celulares (tabla 1).

<u>Tipo</u>	<u>Características</u>
Matriz acelularRequiere la colonización por células del huésped, una vez implantado.
Constructo polimérico con células cultivadas..	..Se utiliza una matriz extracelular artificial en la cual se cultivan las células madre del tejido que se quiere sustituir.
Automontaje celularLa matriz extracelular es sintetizada por las propias células (Auger <i>et al.</i> , 1995).

Tabla 1. Principales tipos de constructos elaborados mediante ingeniería tisular. Junto a cada tipo se muestran sus principales características.

Una vez fabricado el constructo, éste debe ser implantado en el receptor en las mejores condiciones, bien en fresco (dentro de los primeros 5 días desde su fabricación) (Parenteau, 1999), o bien conservado a -70° C (Naughton, 1999) hasta el momento de su implantación.

3.1.3. *Integración en un sistema vivo:*

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

Finalmente, el constructo debe ser biocompatible, lo cual significa que el órgano implantado debe adaptarse a la zona receptora y llevar a cabo las funciones específicas de ese tejido sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria local. En ocasiones, una respuesta inflamatoria independiente de la respuesta inmune puede hacer fracasar el implante. Esto es especialmente importante, por ejemplo en el caso de sustitutos de vasos sanguíneos que produzcan fenómenos de trombosis por no ser biocompatibles.

3.2. Ingeniería tisular de la córnea.

Como estructura avascular, la córnea es un excelente candidato para la ingeniería tisular. Un constructo corneal debe llevar a cabo de forma eficiente todas las funciones de la córnea, incluyendo la de la barrera frente a agentes externos y la de permitir la transmisión y refracción de la luz. Además, debe tener una forma y curvatura adecuadas y debe poder ser implantado quirúrgicamente.

La necesidad de constructos corneales es real, debido a la escasez de donantes (muy importante en países subdesarrollados, ya sea por motivos religiosos, culturales o de infraestructura sanitaria), por el problema del rechazo del injerto alogénico y por la posibilidad de transmisión de enfermedades al huésped.

Diversos laboratorios que trabajan en el diseño de constructos corneales mediante ingeniería tisular, han establecido tres criterios mayores que deben cumplir todos los constructos corneales (Chirila, 1994; Leibowitz *et al.*, 1994): a) el constructo debe permanecer estable en el ojo receptor durante largos periodos de tiempo, y no debe actuar como un estímulo inflamatorio o inmunológico; b) la óptica central debe ser transparente y formar una imagen de alta calidad sobre la retina; c) el componente estromal debe permitir el crecimiento en su interior de los queratocitos estromales, la producción y el depósito de matriz extracelular y estar permanentemente fijo. Otros autores han añadido varios criterios adicionales: a) los constructos deben ser anclados mediante la colonización de queratocitos y depósito de proteínas en la interfase para desarrollar suficiente fuerza de tensión, que mantenga el constructo en su sitio. Asimismo, debe tener suficiente fuerza y resistencia para poder ser suturados y evitar así la extrusión; b) el componente periférico debe permitir el paso de nutrientes a su través; c) la superficie anterior debe estar cubierta por capas de epitelio corneal, el cual debe ser capaz de repararse ante una agresión externa; d) la superficie posterior no debe ser atacada

por células o proteínas, esto es, no debe ser susceptible a la degradación enzimática ni al rechazo inmune.

Los sustitutos corneales se pueden dividir en dos tipos: a) queratoprótesis, fabricadas con polímeros sintéticos biocompatibles, que constan de un núcleo central con una función óptica y una zona periférica que permite la migración celular desde el huésped para anclar la prótesis, y b) equivalentes corneales, fabricados con células corneales cultivadas sobre materiales biológicos.

3.2.1. *Prótesis corneales artificiales (queratoprótesis).*

Desde el siglo XVIII, se han intentado producir córneas sintéticas. En primer lugar, se utilizaron cristales implantados en ojos opacos, pero éstos eran rápidamente extruidos. Más tarde, se utilizaron diferentes materiales como celulosa o polimetilmetacrilato (PMMA) (Castroviejo *et al.*, 1964). Un error común fue que la periferia de los injertos no era biocompatible con el órgano receptor, con lo cual no se producía colonización celular del mismo; para solucionar este problema se realizaron prótesis con la óptica de PMMA rodeada de politetrafluoroetileno (PTFE) y reforzada con Dacron y tejido autólogo (Cardona, 1964). Basándose en la creencia de que un material biológico sería mejor tolerado que un material sintético, se diseñó la *osteodontoprótesis* (figura 15A) (Strampelli y Marchi, 1970). Esta técnica utiliza un núcleo óptico acrílico introducido en un diente. Posteriormente la porción dental fue reemplazada por cerámica (Blenke *et al.*, 1978) y finalmente, se reemplazó por hueso (Caizza *et al.*, 1990).

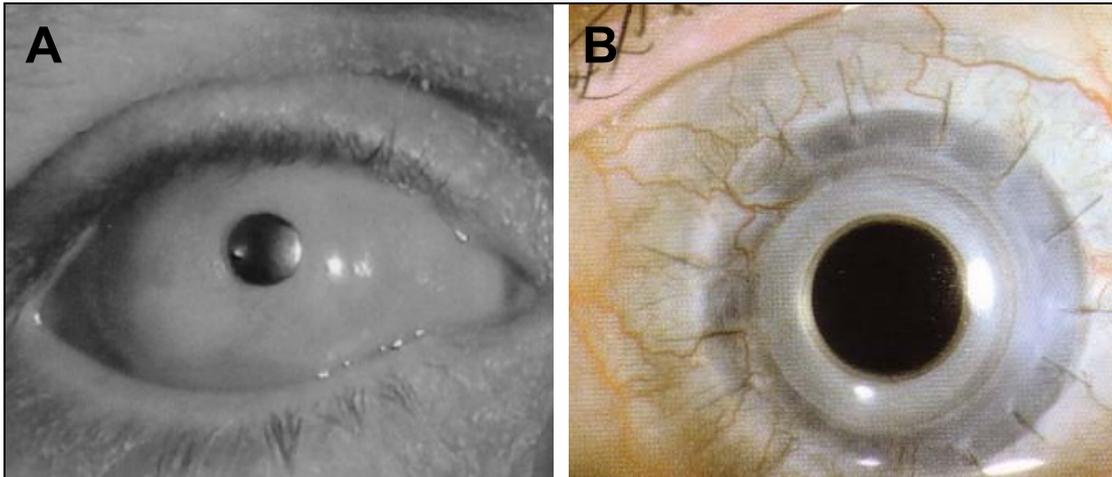


Figura 15. Ejemplos de prótesis corneales artificiales (queratoprótesis).
A: Osteodontoprótesis. B: Queratoprótesis de PMMA.

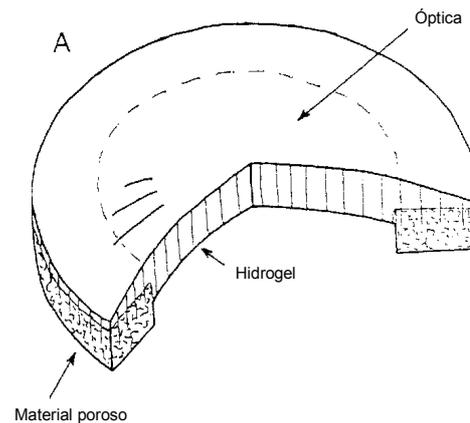
En los años ochenta se aceptó que la ausencia de extrusiones y la aceptación de la prótesis por parte del receptor dependían de la presencia de queratocitos estromales y de la posibilidad de que éstos migraran hacia la prótesis y depositaran matriz extracelular en ella. Para facilitar estos factores, se empezó a trabajar con diversos materiales porosos tales como el Proplast (Barber *et al.*, 1980) asociado a un cilindro central de PMMA o las mallas de propileno (Trinkaus-Randall *et al.*, 1990 y 1991). Diversos estudios demostraron que éstas últimas presentaron menor porcentaje de extrusiones que los primeros (White y Gonna, 1998).

El material utilizado en la zona óptica debe cumplir una serie de requisitos:

- a) requisitos ópticos: permitir la transmisión de la luz visible, protegiendo la retina de las radiaciones ultravioleta (debe absorber radiaciones con longitudes de onda por debajo de 300 nm), tener propiedades de tensión similares a la córnea, una adecuada curvatura anterior y posterior y tener un índice de refracción fijo y estable;
- b) requisitos histológicos: permitir el paso de nutrientes a su través y permitir la colonización de su superficie por células epiteliales de la córnea del receptor. Para ello hasta la fecha se han utilizado diversos materiales como PMMA, vidrio (Van

Andel *et al.*, 1988), o silicona (Legeais *et al.*, 1994), los cuales únicamente cumplen los requisitos ópticos, e hidrogeles de alcohol polivinílico (Trinkaus-Randall *et al.*, 1988). Éstos últimos, unidos a un material poroso periférico, y tras tratamiento con plasma pueden cumplir ambos tipos de requisitos (Tsuk *et al.*, 1997; Latkany *et al.*, 1997).

Figura 16. Representación esquemática de un hidrogel asociado a un material poroso periférico.



Hasta la fecha, los estudios *in vivo* se han centrado más en la viabilidad del constructo corneal a largo plazo, que en conseguir un adecuado poder refractivo para recuperar la visión. La implantación de prótesis corneales con un anillo de material poroso y una óptica de silicona (Legeais *et al.*, 1995) o hidrogel (figura 16) (Trinkaus Randall *et al.*, 1997) han presentado diferentes problemas, destacando la extrusión, la fibroplasia del material poroso con pérdida de la transparencia y la dificultad para la colonización celular.

En general, las queratoprótesis han arrojado resultados desalentadores a largo plazo, reservándose su uso para casos en los que fracasa la queratoplastia, por lo que los investigadores han continuado la búsqueda de sustitutos corneales verdaderamente biocompatibles con el receptor.

3.2.2. Prótesis corneales biológicas (equivalentes corneales).

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

Utilizando técnicas de ingeniería tisular, diferentes investigadores han intentado desarrollar un sustituto eficaz de la córnea que pudiera implantarse sin las desventajas del trasplante de córnea heterólogo (Nishida *et al.*, 2003 y 2004; Reichl *et al.*, 2004). Con este objetivo, algunos investigadores han propuesto diferentes técnicas de ingeniería tisular para la construcción de una córnea de origen animal, como un primer paso en el desarrollo de un sustituto corneal humano (Minami *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1999; Zieske *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque algunos científicos han desarrollado sustitutos que imitan parcialmente a la córnea humana (Griffith *et al.*, 1999), hasta la fecha no se ha conseguido desarrollar un constructo corneal de espesor completo con las características histológicas y funcionales de la córnea humana.

La mayoría de los sustitutos corneales se fabrican a partir de cultivos tridimensionales de las tres estirpes celulares de la córnea, sobre estromas artificiales fabricados con biomateriales (Nishida, 2003). Un buen biomaterial debería ser biocompatible, transparente y consistente, y las células deberían poder adherirse y crecer sobre él; los principales materiales utilizados para la construcción de córneas en laboratorio son el colágeno tipo I y la fibrina. El colágeno tipo I se ha utilizado durante mucho tiempo en la fabricación de piel artificial, mucosa oral,

córneas y otros tejidos (Griffith, 1999; Llames *et al.*, 2004; Meana *et al.*, 1998; Orwin y Hubel, 2000; Reichl, 2003), sin embargo, el colágeno tipo I es un material costoso y tiende a contraerse y a perder volumen cuando se cultivan células en su interior (Porter, 1998; Tegtmeier, 2001). Además, los sustitutos corneales fabricados a partir de colágeno son poco estables y tienden a degradarse en poco tiempo (Chen, 2005). Por otra parte, la fibrina de origen humano ha sido propuesta como sustituto estromal para diferentes constructos tisulares, especialmente para la piel humana (Llames *et al.*, 2004; Meana *et al.*, 1998). Frente al colágeno, la fibrina tiene varias ventajas destacando su bajo precio, su disponibilidad, la buena tolerancia a las células y la ausencia de la contracción del constructo. Otros componentes como la agarosa son utilizados menos frecuentemente en ingeniería tisular, debido al escaso crecimiento que muestran las células cuando se incluyen en hidrogeles de este material (Aufderheide, 2005).

En los últimos años se han desarrollado modelos de cultivos celulares que tratan de reconstruir las diferentes barreras oculares (córnea, conjuntiva, barrera hematorretiniana) (Honorf, 2005). La fabricación de equivalentes corneales de espesor completo constituirían herramientas muy útiles en la investigación médica y farmacológica, y podrían ser muy útiles para llevar a cabo estudios de absorción de fármacos dentro de los tejidos oculares (Reichl, 2003 y 2004; Tegtmeier, 2001), investigación de condiciones oculares patológicas, estudios de toxicidad *in vivo* sin la necesidad de utilizar animales vivos de laboratorio, e incluso estudios de respuesta de materiales biológicos a la ultracongelación (Ebertz, 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Construcción de un equivalente corneal de espesor completo de la córnea del conejo de laboratorio por ingeniería tisular, como modelo de ensayo para el tratamiento de las enfermedades corneales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Establecer y optimizar las condiciones de laboratorio para el cultivo de células de la córnea: células epiteliales, estromales y endoteliales. Analizar las características histológicas de las células mantenidas en cultivo.

2.- Establecer un método para la identificación genotípica de las células mantenidas en cultivo mediante RT-PCR para genes específicos de las tres principales estirpes celulares de la córnea.

3.- Fabricación *in vitro* de distintos tipos de sustitutos estromales y determinación en cada uno de ellos de la transparencia, consistencia y biocompatibilidad celular. Se utilizarán queratocitos corneales inmersos en cuatro tipos diferentes de sustitutos estromales:

- Geles de agarosa al 2%.
- Geles de fibrina humana.
- Geles de fibrina y agarosa al 0,1%.
- Geles de colágeno tipo I.

4.- Fabricación *in vitro* de equivalentes corneales de espesor completo. Para ello, las células correspondientes al epitelio de la córnea se cultivarán sobre los sustitutos estromales, mientras que las células endoteliales corneales se cultivarán en la cara inferior del estroma.

5.- Analizar las características histológicas de los equivalentes corneales sintetizados en laboratorio mediante microscopía óptica y electrónica (de transmisión y de barrido).

6.- Caracterización de la expresión de proteínas específicas en el epitelio (citoqueratina 3) y el estroma (vimentina) de los equivalentes corneales generados mediante ingeniería tisular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE CÓRNEAS Y LIMBOS ESCLEROCORNEALES DE CONEJOS DE LABORATORIO.

Para la realización de la presente estudio, hemos utilizado un total de veinte córneas y limbos esclerocorneales procedentes de diez conejos de laboratorio (*Oryctolagus cuniculus*) de aproximadamente 2 kg de peso, de la raza *New Zealand White* que superaron satisfactoriamente el periodo de cuarentena exigido, respetando la normativa existente sobre el manejo de animales para experimentación científica. Todos los animales fueron adquiridos en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (ref. ANI078).

El mantenimiento de los animales previo a la extracción quirúrgica de las muestras se realizó en las instalaciones homologadas que para tal fin posee la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, en jaulas individuales especiales para conejos (figura 17). Los animales fueron alimentados con pienso para conejos (*Rabbit Diet*[®] de la casa comercial B&K) hasta el momento de la intervención. En la Unidad de Experimentación Animal existe personal eficiente para el cuidado de los animales utilizados, incluyendo limpieza, vigilancia, observación, alimentación y transporte. Las intervenciones quirúrgicas practicadas para la extracción de las córneas se llevaron a cabo en los quirófanos de Cirugía Experimental Animal de la mencionada Unidad de Experimentación Animal. Estos quirófanos están equipados con antequirófano, zona de esterilización de material y de desinfección del personal, mesa y lámpara de operaciones, equipo de reanimación en caso de parada y equipo de anestesia general con ventilación mecánica asistida (figura 18). Como material de apoyo a la cirugía, los quirófanos de Cirugía Experimental cuentan con equipos de infusión de suero y drogas vía parenteral, suturas quirúrgicas normalizadas, drogas anestésicas y aparatos de electrocardiografía monitorizada.

La extracción de las córneas y los limbos esclerocorneales de los conejos de laboratorio se llevó a cabo en animales sacrificados mediante inyección intracardiaca de 2 ml de cloruro potásico 1M. En todos los casos, el sacrificio se realizó en animales sometidos a anestesia general mediante inyección intramuscular de Clorhidrato de Ketamina (Parke-Davis S.A.) a dosis de 100 mg por kilogramo de peso corporal, 10 minutos antes del sacrificio (Alaminos *et al.*, 2004).

Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción de las córneas y los limbos esclerocorneales, utilizando para ello un blefarostato pediátrico y material de microcirugía. Durante la extracción, se prestó especial atención a evitar el daño endotelial, así como a minimizar al máximo la contaminación por fibroblastos procedentes de la conjuntiva o del iris, que fueron cuidadosamente extirpados utilizando un microscopio quirúrgico (figura 19).

Una vez extraídas, las córneas se lavaron en suero fisiológico y se mantuvieron en frío (4° C) en un medio de transporte estéril consistente en medio de cultivo RPMI suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml) y anfotericina B (0,25µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hasta el momento de su procesamiento. Todas las córneas se procesaron durante las 6 horas posteriores a su extracción para asegurar una elevada supervivencia celular y tisular.

Como parte del proyecto de investigación FIS 04/1983, el proyecto fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.



Figura 17. Jaulas-animalario especiales para conejos de experimentación. Como puede apreciarse en la imagen, cada conejo poseía una jaula individual provista de comedero y bebedero automáticos.

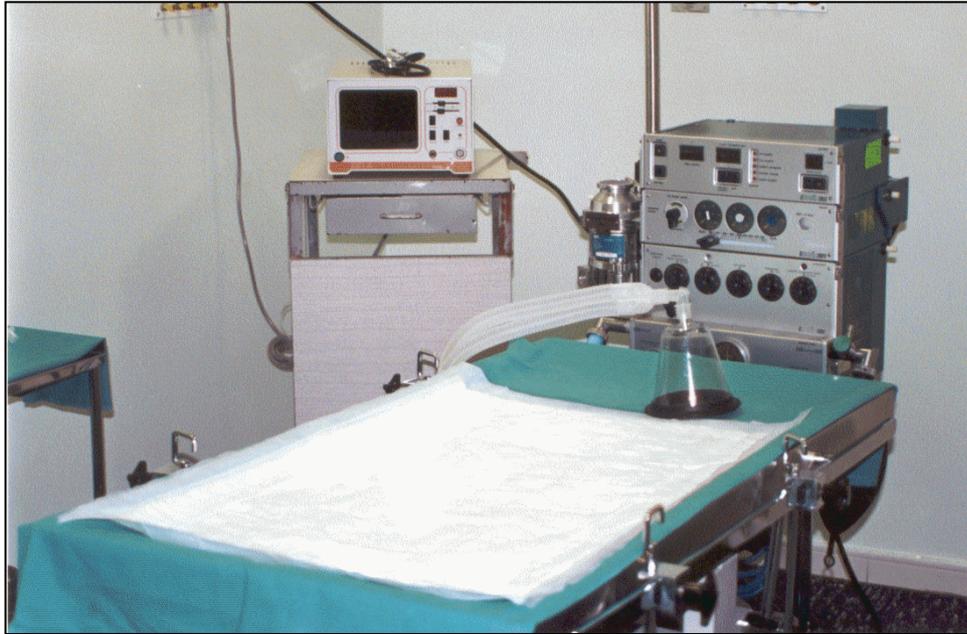


Figura 18. Mesa de operaciones. Utilizada en todas las intervenciones llevadas a cabo en este trabajo.

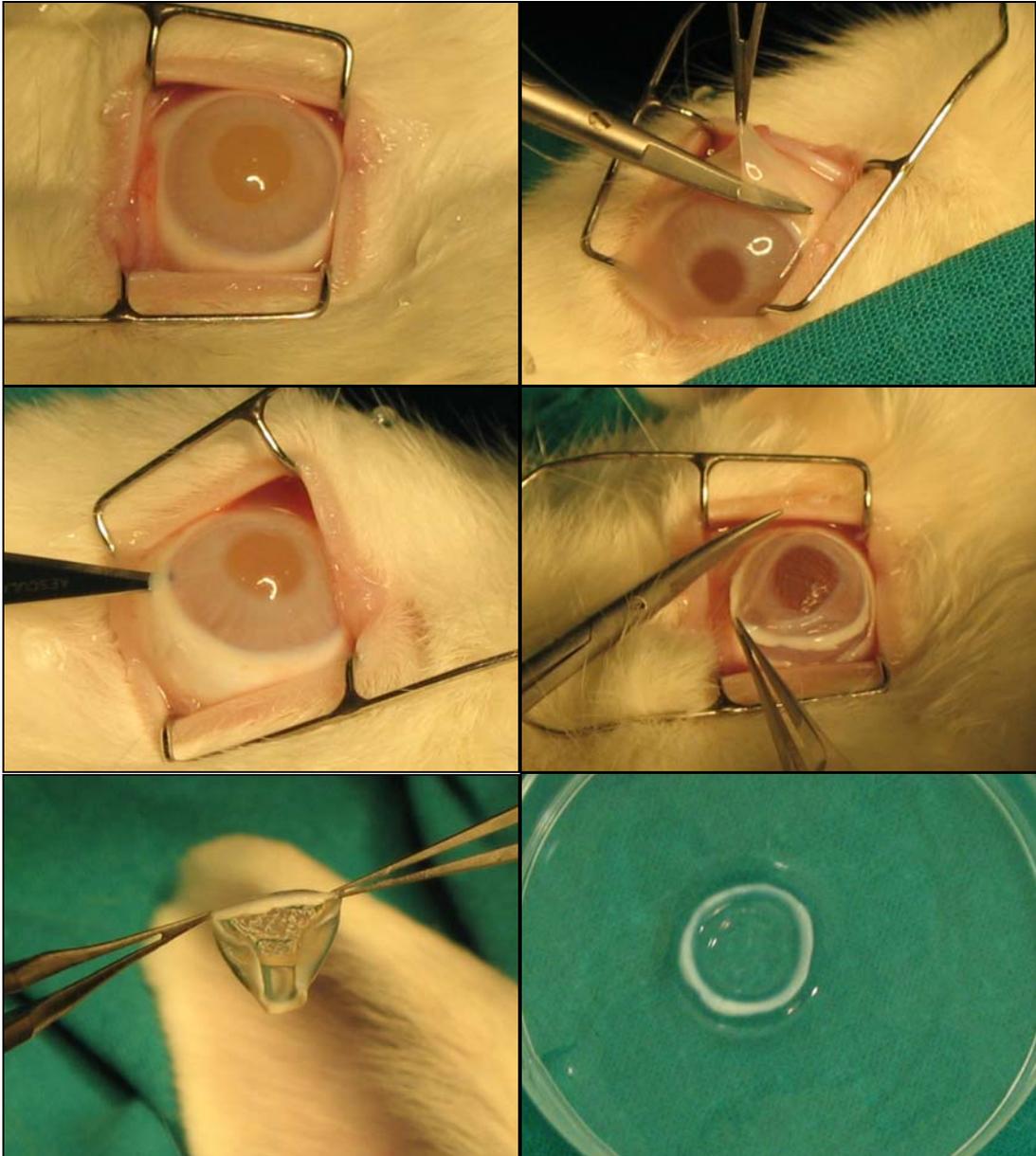


Figura 19. Extracción de córneas y limbos esclerocorneales de conejos de laboratorio. Exposición con blefarostato pediátrico, peritomía conjuntival de 360° y disección de conjuntiva con tijeras de Wescott, incisión en cámara anterior con bisturí y queratectomía con tijeras de Wescott incluyendo 2 mm de esclera

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

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo DMEM y HAM-F12 utilizados en este trabajo. Todos los valores están expresados en gramos por litro de medio de cultivo.

2. DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS PROCEDENTES DE LA CÓRNEA DEL CONEJO DE LABORATORIO.

Transcurrido el periodo de transporte, las córneas fueron lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1.25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

A continuación, y para obtener los tres tipos fundamentales de células que constituyen la córnea del conejo (células endoteliales, estromales y epiteliales), utilizamos una técnica de aislamiento secuencial según se describe más adelante. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

2.1. Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales Corneales.

Para el aislamiento y cultivo de células endoteliales, las córneas extraídas fueron sometidas a digestión enzimática en una solución de tripsina 0.5 g/l-EDTA 0.2 g/l (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) durante 10 minutos a 37° C. A continuación, la capa de endotelio corneal se separó mecánicamente mediante disección de la membrana de Descemet bajo magnificación microquirúrgica.

Una vez separada, los fragmentos de endotelio corneal se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie, utilizando medios de cultivo específicos para células endoteliales (medio **ME**). La composición del medio **ME**, consistente en una modificación del medio QC descrito por De Diego *et al.* (2004) y Llames *et al.*

(2004) para el cultivo de queratinocitos de la piel humana, se describe a continuación:

1. Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinhem, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinhem, Alemania).
3. Adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
4. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B).
5. Factores de crecimiento para células 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).

2.2. Aislamiento y cultivo de Células Epiteliales Corneales.

Una vez desprovistas del endotelio, las córneas de los conejos de laboratorio se tallaron quirúrgicamente para separar el limbo esclerocorneal del cuerpo de la córnea (figura 20). A continuación, los limbos esclerocorneales individualizados se examinaron bajo visión microscópica, eliminándose cualquier resto de conjuntiva, iris u otros tejidos que pudiesen contaminar o impedir el crecimiento de las células epiteliales corneales.

Para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales, los limbos esclerocorneales fueron divididos en pequeños explantes de alrededor de 2 X 2 mm² y unas 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 bocabajo (con el epitelio en contacto directo con la superficie) en frascos de cultivo estériles de 25 cm² de superficie desprovistos de medio de cultivo. Quince minutos más tarde, cuando los explantes se hubieron adherido a las superficies de cultivo, se procedió a añadir el medio de cultivo específico para células epiteliales.

Para evitar el crecimiento no deseado de queratocitos y fibroblastos, cuya tasa de proliferación es habitualmente muy superior a la de las células epiteliales de la córnea, los explantes de limbo 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:

A- En primer lugar, se empleó medio de cultivo selectivo para células epiteliales (**MP**), el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales corneales sobre los fibroblastos y los queratocitos. El medio **MP** estaba compuesto por una modificación del medio **ME** previamente descrito, tal como se detalla a continuación:

1. Tres 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).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinhem, Alemania).

3. Adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
4. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B).
5. Factores de crecimiento para células epiteliales en cultivo:
 - Insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. I2767).
 - 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).
 - Factor de crecimiento epidérmico EGF (10 ng/ml) (Becton-Dickinson Ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU)

B- En segundo lugar, la mitad de los explantes esclerocorneales se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie que contenían una capa de células alimentadoras 3T3 (ECACC 85022108) inactivadas a una densidad de $8-10 \times 10^3$ células/cm². 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. Las células 3T3 (Figura 21) proceden del tejido conectivo de fetos de ratones de laboratorio y presentan una tasa de proliferación muy elevada, por lo que es necesario inactivarlas antes de iniciar el cultivo de los queratinocitos (Rheinwald y Green, 1975-1 y 1975-2). Su presencia en el cultivo, sin

embargo, garantiza la disponibilidad de gran número de factores de crecimiento y facilita la adhesión de las células epiteliales corneales, inhibiendo la proliferación de los fibroblastos y queratocitos del estroma.

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 cm².

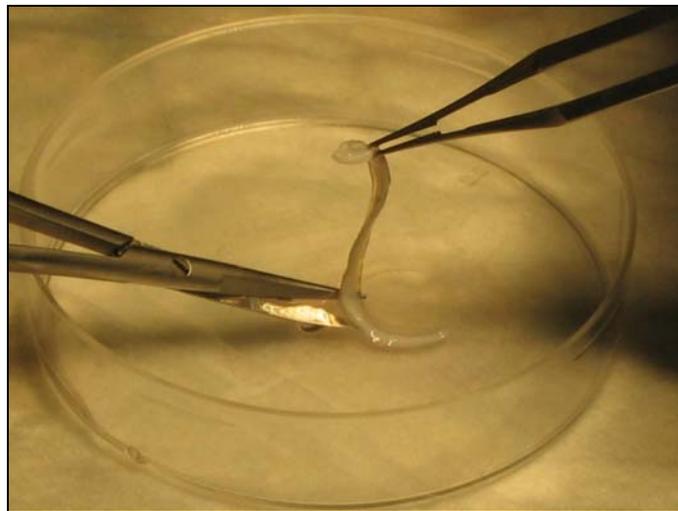


Figura 20. Aislamiento del limbo esclerocorneal a partir de córneas de conejo desprovistas del endotelio.

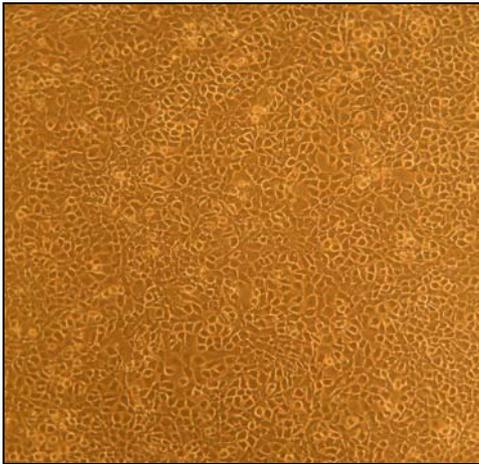


Figura 21. Cultivo subconfluente de células alimentadoras 3T3 de embrión de ratón. Estas células se utilizaron para favorecer el crecimiento selectivo de las células epiteliales corneales e inhibir la proliferación de las células estromales.

2.3. Aislamiento y cultivo de Queratocitos Estromales.

Una vez desprovistas del endotelio y del limbo esclerocorneal, la cara estromal de las córneas se fragmentó en pequeños explantes de unos 3 mm de longitud que se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie en presencia de medio de cultivo para queratocitos (**MQ**). El medio **MQ**, desprovisto de factores de crecimiento, estaba compuesto por:

1. Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con L-glutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinhem, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinhem, Alemania).
3. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B).

3. SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE LA CÓRNEA.

Una vez alcanzada la confluencia, los distintos cultivos celulares se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1 ml de medio de cultivo ME, MP o MQ. La presencia de abundantes proteínas séricas en los medios de cultivo ME, MP y MQ es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio ME, MP o MQ y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de células epiteliales y endoteliales se expandieron hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo, mientras que los queratocitos estromales se expandieron unas quince veces antes de su uso para fabricar los sustitutos de corneales. En los casos en los que se utilizaron células alimentadoras 3T3 en el cultivo primario, estas células se utilizaron también para los distintos subcultivos celulares.

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

4. CONGELACIÓN DE CÉLULAS.

Para su conservación a largo plazo, los cultivos confluentes de células se procesaron y congelaron a temperatura de nitrógeno líquido. Para ello, las células epiteliales, estromales y endoteliales se trataron con una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo. Para neutralizar la tripsina, se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo ME, MP o MQ (todos ellos contienen un 10% de suero bovino fetal), obteniéndose las células separadas mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras esto, las células se mantuvieron sobre hielo y se resuspendieron en medio de congelación celular (10% de DMSO, 10% de suero bovino fetal y 80% de DMEM) en viales especiales para ultracongelación. Para evitar un choque térmico demasiado brusco, las células incluidas en el medio de congelación se congelaron a -20°C durante las primeras 12-24 h, pasándose a continuación a una temperatura de -60° durante 24 horas y, finalmente, a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron a largo plazo.

5. DESARROLLO DE MATRICES EXTRACELULARES: ELABORACIÓN DE SUSTITUTOS DEL ESTROMA CORNEAL.

Para la creación de matrices extracelulares de soporte o sustitutos estromales, se utilizaron cuatro modelos diferentes: geles de agarosa al 2%, geles de fibrina, geles de agarosa más fibrina y geles de colágeno tipo I, tal como se detalla a continuación.

5.1. Fabricación de geles de agarosa al 2%.

Para la generación de sustitutos del estroma corneal, se empleó agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta en PBS. En primer lugar, se disolvió la agarosa sólida al 2% (p/v) en PBS, calentando la mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Esta solución de agarosa al 2% en PBS se esterilizó a 120°C y 2 atmósferas de presión mediante autoclavado. Para la fabricación de sustitutos estromales, se incubaron al baño María unos 2 ml del gel de agarosa hasta alcanzar el punto de fusión, momento en el que se añadieron 50.000 queratocitos obtenidos mediante tripsinización del cultivo primario de células estromales de la córnea. Para llevar a cabo esta acción, se tuvo especial cuidado en utilizar la disolución de agarosa a temperaturas muy bajas, cercanas al punto de gelificación, evitando así el daño térmico a los queratocitos de la mezcla. Una vez mezcladas las células y la disolución de agarosa, la mezcla aún líquida se alicuotó en recipientes estériles de cultivo celular y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 5 minutos (figura 22).

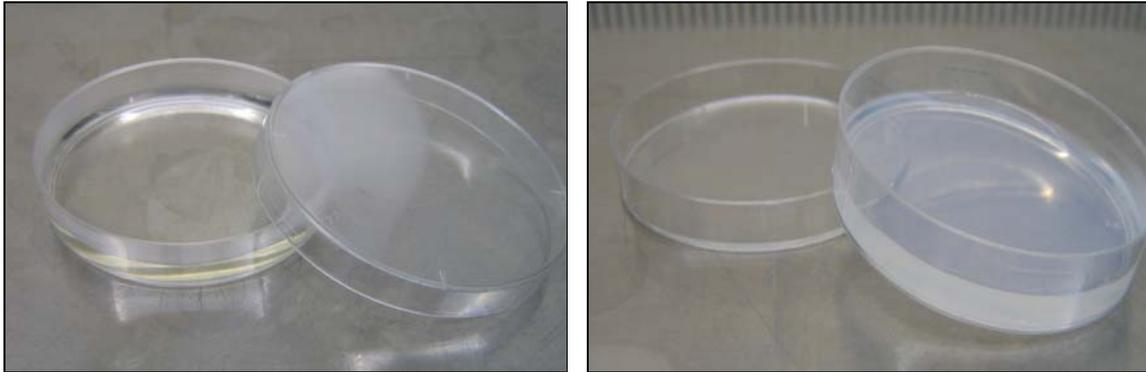


Figura 22. Gel de agarosa al 2% sobre una placa de Petri estéril para cultivo celular. En la imagen de la izquierda se aprecia el gel en estado líquido, mientras que a la derecha se aprecia el mismo gel después de solidificar.

5.2. Fabricación de geles de fibrina humana.

Para la generación de geles de fibrina humana, se utilizó plasma sanguíneo humano congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT). La fabricación de sustitutos estromales de fibrina con queratocitos corneales se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (Llames *et al.*, 2004; Meana *et al.*, 1998). Para ello, se utilizaron 50.000 queratocitos procedentes de los cultivos primarios, resuspendidos en 2 ml de medio de cultivo DMEM, a los cuales se añadieron unos 5 ml de plasma sanguíneo humano (equivalente a 10-12 mg de fibrinógeno) y 14 ml de suero salino al 0,9%. Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se añadieron 200 μ l de ácido tranexámico (Amchafibrín[®], Fides Ecofarma, Valencia, España). Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición de 1 ml de Cl_2Ca 0,025 mM a la mezcla, alicuotándose ésta inmediatamente en pocillos, placas de Petri o frascos de cultivo (figura 23). Los

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

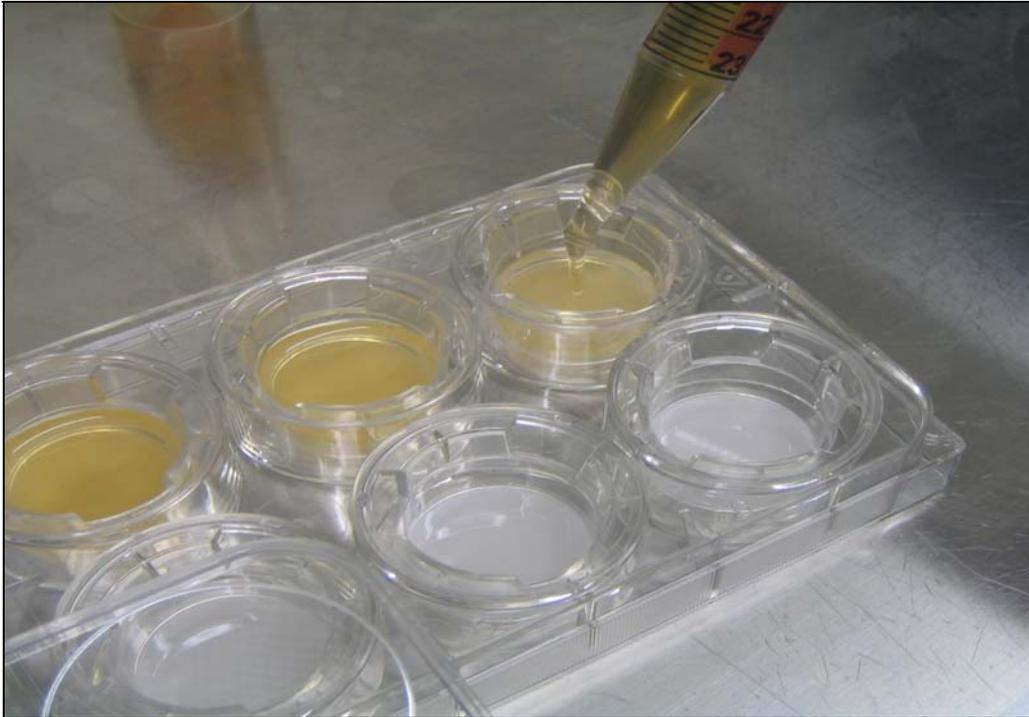


Figura 23. Preparación de sustitutos estromales de fibrina humana. La mezcla que contenía el plasma, los queratocitos, el agente antifibrinolítico, el suero salino y el cloruro cálcico se alicuotó en las superficies de cultivo (insertos porosos) antes de que comenzara la reacción de coagulación del plasma.

5.3. Fabricación del geles de agarosa más fibrina.

Para la elaboración de geles de agarosa y fibrina, se obtuvo una mezcla de fibrina, suero salino, ácido tranexámico y queratocitos tal como se describió en el apartado anterior. Sin embargo, justo después de precipitar la reacción de coagulación con cloruro cálcico, se añadió una pequeña cantidad de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. La concentración final de agarosa en el gel fue del 0,1% (p/v). Una vez mezclados todos los componentes, y evitando un

trauma físico excesivo, estos geles se alicuotaron cuidadosamente en diferentes superficies de cultivo.

5.4. Fabricación de geles de colágeno.

Los geles de colágeno se prepararon utilizando colágeno tipo I de cola de rata disponible comercialmente (Roche Diagnostics Ref. 11179179001, Basilea, Suiza) y siguiendo la metodología previamente establecida por otros autores (Lee y Cho, 2005; Navarro *et al.*, 2001) y por la propia casa comercial. En primer lugar, el colágeno liofilizado se redisolvió en 3 ml de una solución estéril de ácido acético al 0,2% durante 12 h sin agitación. Posteriormente, para la generación de sustitutos del estroma corneal, se añadieron 50.000 queratocitos tripsinizados del cultivo primario y resuspendidos en 200 μ l de medio de cultivo MQ. Para inducir la gelificación de la solución de colágeno tipo I con células estromales, se añadieron a la mezcla 300 μ l de una solución de bicarbonato sódico estéril (25 mg/ml), alicuotándose la mezcla rápida pero cuidadosamente en los pocillos destinados a la generación de los constructos corneales. De este modo, mediante aumento del pH, las fibras de colágeno disueltas en ácido comenzaron a formar un gel semisólido que se dejó secar durante 2 h en incubador a 37°C.



Figura 24. Preparación de geles de colágeno.

6. CONSTRUCCIÓN DE EQUIVALENTES CORNEALES MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.

La construcción de equivalentes corneales organotípicos se llevó a cabo de modo secuencial. Para ello, en primer lugar se sembraron las células endoteliales corneales en la base de los constructos corneales para, en un segundo tiempo, elaborar un sustituto estromal. Finalmente, en un tercer tiempo, se fabricó un equivalente epitelial corneal en la superficie del mismo.

Además, para garantizar una correcta diferenciación y estratificación del epitelio construido, se utilizó la técnica de cultivo denominada *interfase aire-líquido* (Reichl y Müller-Goymann, 2003). Para ello, los constructos corneales se elaboraron en sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0.4 µm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU). Estos sistemas de cultivo están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato (figura 25). El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro.

Para la construcción de las córneas artificiales mediante ingeniería tisular, en primer lugar se obtuvieron alrededor de 500.000 células endoteliales mediante tripsinización de los cultivos primarios de endotelio corneal. Una vez inactivada la tripsina y obtenido un *pellet* celular, las células endoteliales se sembraron directamente sobre la membrana porosa de los insertos Transwell, utilizando medio de cultivo ME. Una vez adheridas las células a la membrana porosa y formada una capa celular confluyente (alrededor de 24 horas más tarde), se procedió a construir un sustituto estromal sobre estas células endoteliales. Para ello, se empleó uno de los sustitutos estromales descritos en el apartado anterior (queratocitos embebidos

en geles de agarosa, fibrina, fibrina más agarosa o colágeno). En tercer lugar, una vez solidificados los sustitutos estromales 24 horas más tarde, se tripsinizaron los cultivos primarios de epitelio corneal, cultivándose las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales en medio MP (unas 500.000 células en cada caso). Finalmente, 15 días después de establecer el cultivo epitelial sobre el sustituto estromal, se utilizó la técnica aire-líquido para favorecer la estratificación epitelial. Para ello, se añadió medio de cultivo MP al depósito inferior del sistema, pero no al superior, que se expuso directamente al aire. Esta técnica aire-líquido se mantuvo durante 15 días más.

Todo el proceso descrito se muestra de forma esquemática en la figura 26.



Figura 25. Sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0.4 μm . (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU).

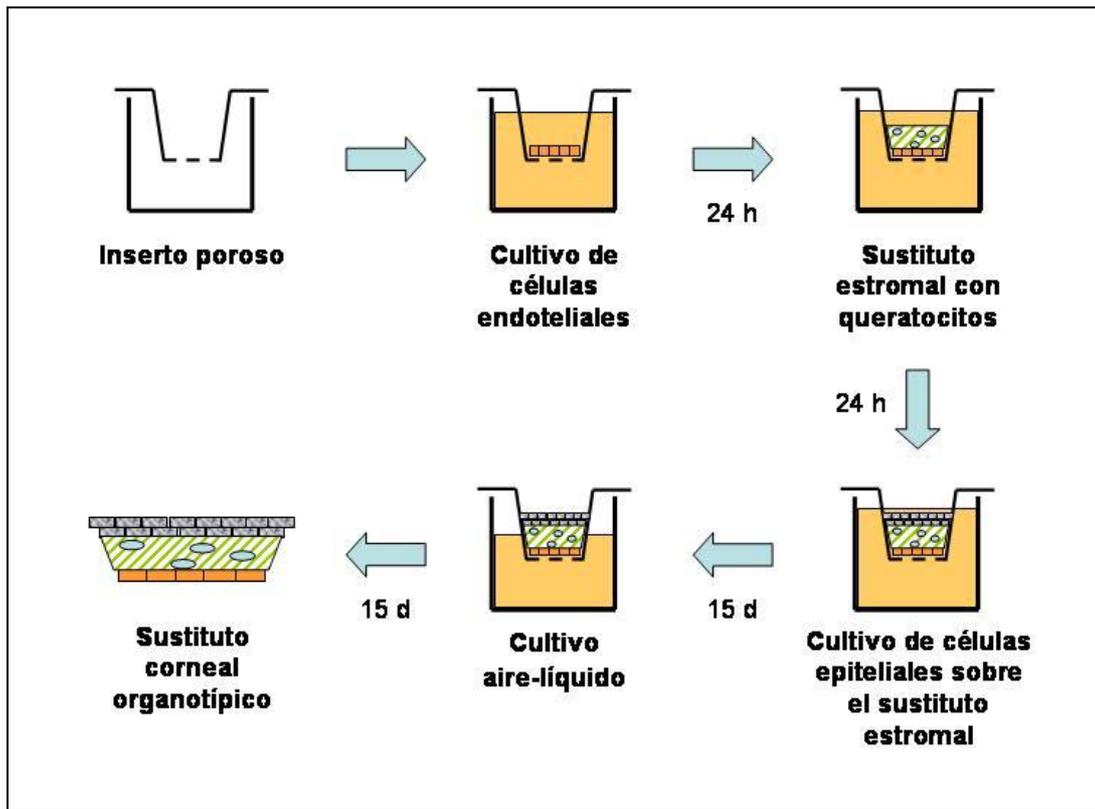


Figura 26. *Elaboración de sustitutos corneales utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo porosos Transwell®.*

7. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES.

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, tanto las muestras control como los constructos corneales artificiales se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4 μm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

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

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 h a 4°C, utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la polimerización de la resina durante 2 h a 60°C. Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichter Ultracut. El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 10 min y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (1963).

La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania)



Figura 27. Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200. Utilizado en esta Tesis Doctoral.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para evaluar la expresión de proteínas específicas (vimentina y queratina 3) en los controles y en los constructos de córnea generados en el laboratorio, se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas sobre dichos tejidos, tal como se describe a continuación:

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

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

Para la identificación de células con expresión específica de vimentina (un marcador de células estromales), se utilizó un anticuerpo primario anti-vimentina de la casa comercial Sigma-Aldrich a una dilución 1:200. Para detectar la expresión específica de queratina 3 (restringida al epitelio corneal normal), se utilizó un anticuerpo anti-queratina 3 denominado AE5 de la casa comercial ICN Pharmaceuticals (Basingstoke, Reino Unido) a una dilución 1:100. Ambos anticuerpos primarios se diluyeron en solución de prehibridación. La incubación frente a los anticuerpos primarios se llevó a cabo en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C.

Una vez concluido el periodo de hibridación frente al anticuerpo primario, las muestras se lavaron en PBS suplementado con un 0,5% de tritón X-100 durante 10 minutos con agitación suave (3 veces). A continuación, las muestras se incubaron en cámara húmeda frente a una dilución 1:500 de un anticuerpo secundario tipo IgG anti-anticuerpos de ratón marcado con biotina (Vector Laboratories Ref. BA-2000) durante 40 minutos, lavándose tres veces en PBS-tritón X-100 tras dicho periodo. La detección de la biotina se efectuó mediante incubación de las muestras en una dilución comercial (1µg/ml) de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Vector Laboratories Ref. SA-5704) en cámara húmeda durante 40 minutos, lavándose las mismas tres veces en PBS-tritón X-100 a continuación. Finalmente, la reacción colorimétrica fue inducida en los tejidos mediante la utilización de un kit comercial para revelado (Vector Laboratories Ref. SK-4100) que contenía diaminobencidina (DAB), peróxido de hidrógeno y un tampón de reacción, de modo que únicamente las zonas positivas (reconocidas específicamente por el anticuerpo primario) se tiñeron de color marrón.

Como contratinción, se utilizó hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich Ref. MHS-16) durante 3 minutos, lavándose las muestras en abundante agua para

eliminar los restos de colorante y deshidratándose en concentraciones crecientes de etanol. Tras sustituir el etanol por xileno, las muestras se montaron con cubreobjetos de vidrio utilizando un adhesivo comercial (VectaMount, Vector Laboratories Ref. H-5000).

En todos los casos, se utilizaron muestras de córnea normal de conejo como control positivo del tiempo de revelado. Como control negativo, se utilizaron las mismas muestras de córnea normal, pero se prescindió del anticuerpo primario.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para la comparación de tasas de crecimiento correspondientes a distintos 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 α del 5% como nivel de significación estadística.

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CORNEALES.

1.1. Cultivo de células de epitelio corneal de conejo.

Las células de epitelio corneal fueron obtenidas a partir de explantes tisulares de limbo esclerocorneal de conejo, los cuales se cultivaron usando medios y técnicas de cultivo celular estándar (medio **MP** con diversos factores de crecimiento). Los explantes limbares se cultivaron directamente sobre frascos de cultivo en presencia o ausencia de células de soporte 3T3 de embrión de ratón, inactivadas mediante tratamiento con mitomicina C.

En ausencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células de epitelio corneal tendieron a migrar desde el explante (figura 28) alrededor del 5º día de cultivo (5.1 ± 2.4 días), alcanzando la confluencia y formando una monocapa de células después de 11 días de cultivo (11.1 ± 5.6 días) (figura 29). En presencia de la capa alimentadora de células 3T3, las células de epitelio corneal comenzaron a desplazar a las células alimentadoras y a adherirse a la superficie del cultivo alrededor del 6º día de cultivo (6.3 ± 2.3 días) (figura 30A), alcanzando la confluencia en 13 días (13.6 ± 5.2 días) (figura 30B). Una vez cultivadas, las células de epitelio corneal mostraron una morfología típica, redondeada, poliédrica o con forma de adoquín (figura 29). A diferencia de los resultados obtenidos y publicados por otros autores (Germain *et al.* 2000), 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 únicamente en el 13.3% de los casos en los que las células epiteliales se cocultivaron con las células 3T3 (2 de 15 cultivos), mientras que esta contaminación fue detectada en el 60% de los cultivos sin la capa alimentadora (9 de 15 cultivos). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para el test exacto de Fisher ($p < 0.01$).

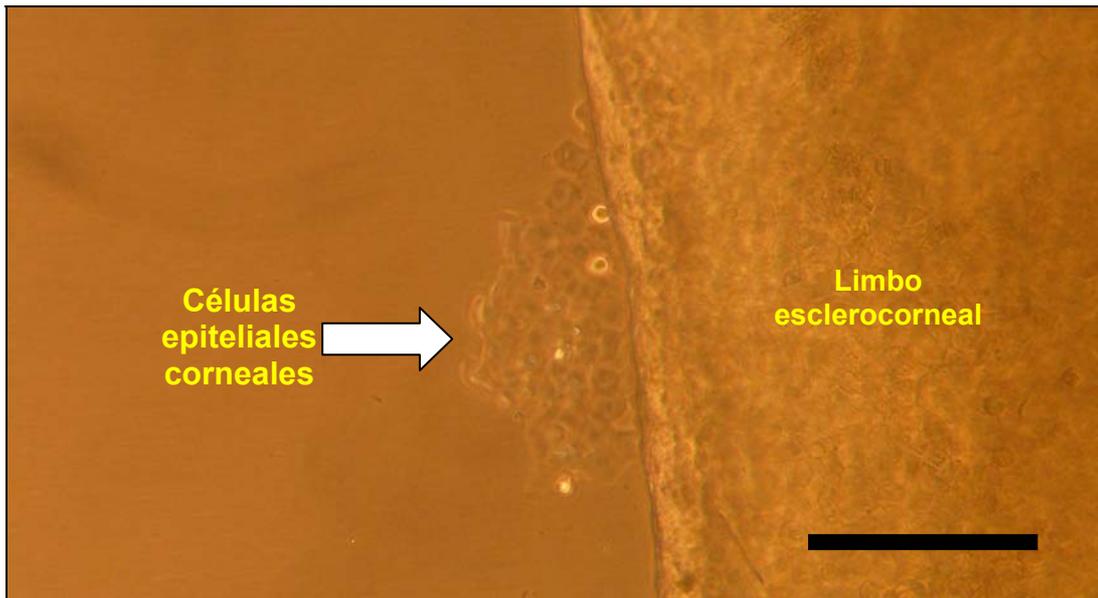


Figura 28. Técnica de cultivo celular epitelial a partir de explantes de limbo esclerocorneal en ausencia de células alimentadoras 3T3. Las células epiteliales corneales comienzan a crecer a partir del explante, adhiriéndose al frasco de cultivo en pocos días (flecha). Imagen tomada con el microscopio de contraste de fases. Escala 300 μm .

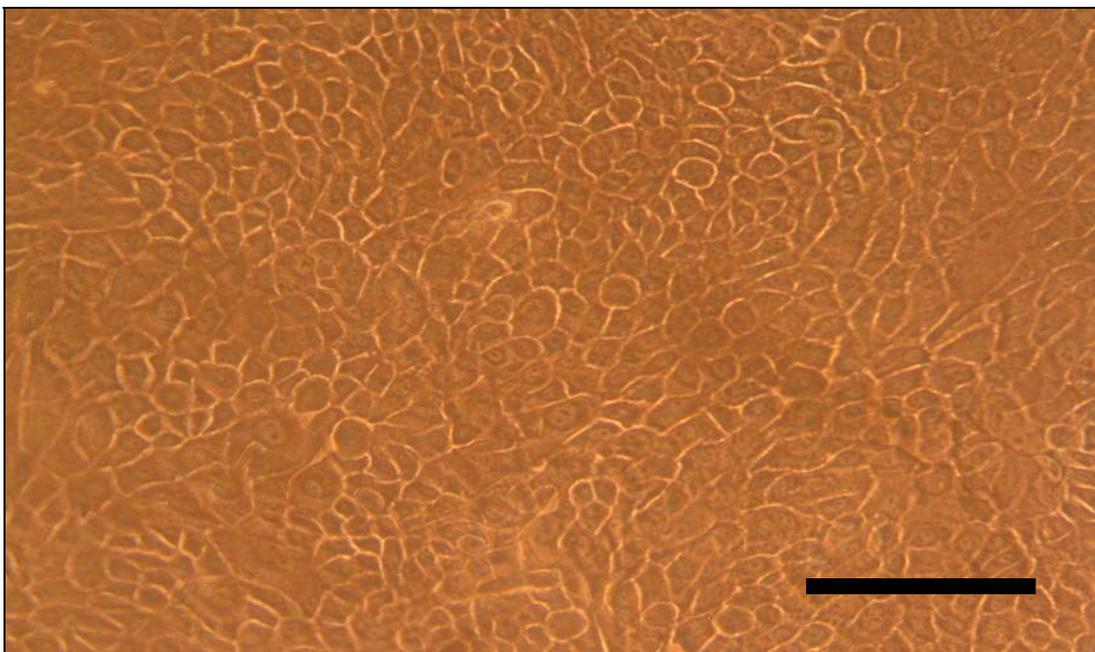


Figura 29. Imagen de microscopía de contraste de fases de un cultivo confluyente de células epiteliales de la córnea. Escala: 200 μm .

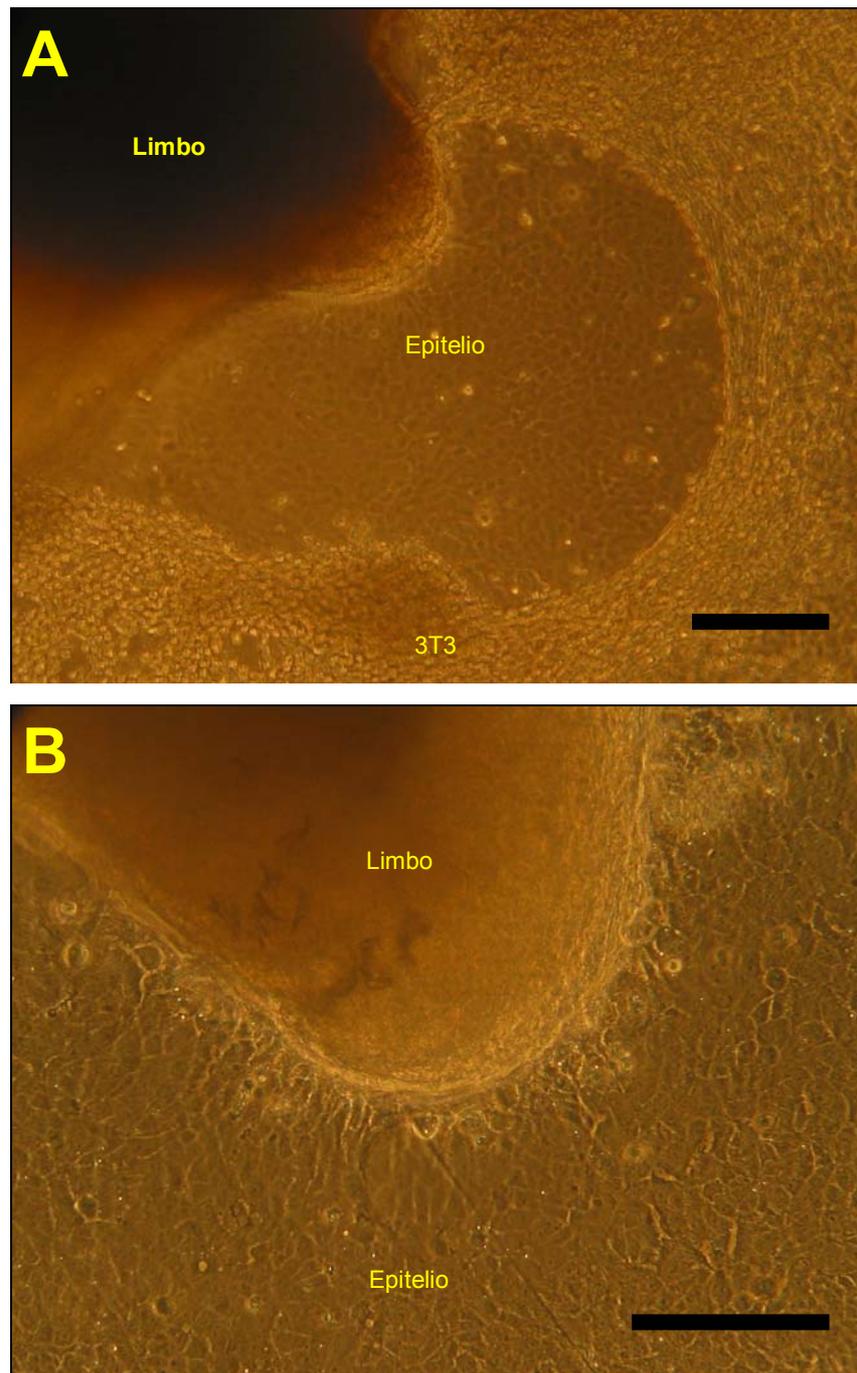


Figura 30. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivos de epitelio corneal de conejo de laboratorio en presencia de células alimentadoras 3T3 inactivadas. A: Cultivo a los 7 días, se está formando una isla de células epiteliales que desplaza a las células 3T3. B: Cultivo a los 21 días, las células epiteliales han desplazado por completo a las células 3T3. Escala: 50 μ m.

1.2. Cultivo de queratocitos estromales.

Los queratocitos estromales fueron cultivados a partir de explantes tisulares obtenidos a partir del estroma corneal de conejo, los cuales se cultivaron usando medios de cultivo celular exentos de factores de crecimiento y utilizando técnicas de cultivo celular estándar.

En cultivo, las células estromales mostraron una morfología alargada, fusiforme o estrellada (figura 31A), mostrando un buen nivel de crecimiento en cultivo. Los queratocitos migraron de los explantes en poco tiempo, alcanzando la confluencia alrededor del 9º día de cultivo (9.12 ± 2.21 días) (figura 31B). De las tres estirpes celulares cultivadas, los queratocitos han sido los que han mostrado una mayor tasa de proliferación. Por este motivo, cuando existieron dos estirpes celulares diferentes en el mismo cultivo, los queratocitos tendieron a proliferar a mayor velocidad que el resto, por lo que acabaron desplazando a las demás células del cultivo.

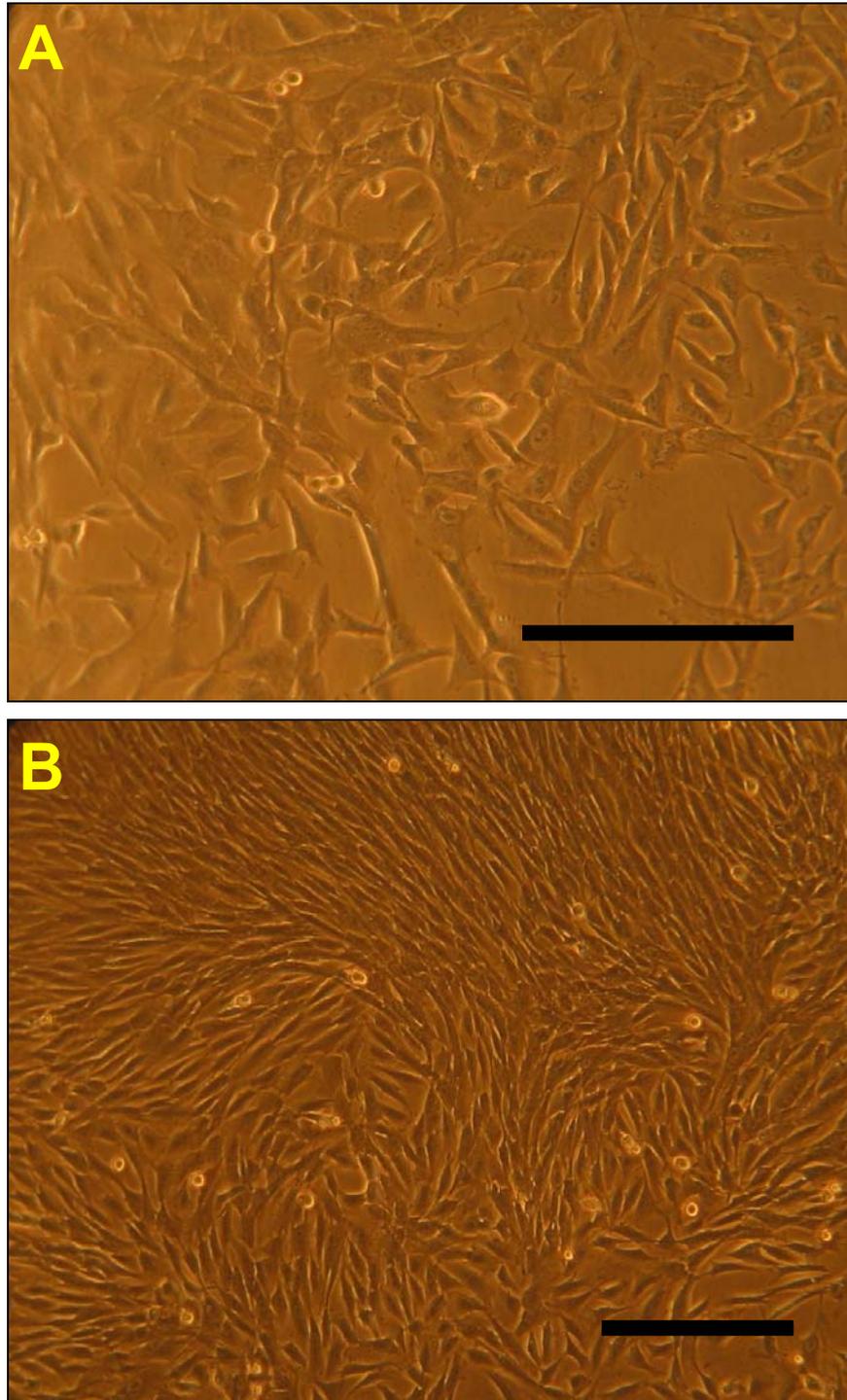


Figura 31. Imágenes de microscopía óptica de cultivos de queratocitos estromales de córnea de conejo de laboratorio. A: Cultivo a los 7 días. B: Cultivo subconfluyente a los 14 días. Escala: 200 μm .

1.3. Células de endotelio corneal de conejo.

Las córneas de conejo fueron sometidas a tratamiento enzimático para facilitar la separación mecánica de la membrana de Descemet (con endotelio adherido a su cara posterior) de la superficie estromal posterior. Este complejo Descemet-endotelio fue cultivado en medios de cultivo suplementados con distintos factores de crecimiento.

El cultivo tuvo éxito en un 50% de los casos (5 de 10 córneas). En cultivo, las células estromales mostraron similitudes morfológicas con las células endoteliales *in vivo*, aunque las células tendieron a mostrar formas más bien poligonales y elongadas (figuras 32 y 33), más que la típica forma hexagonal que muestran en la córnea original. Las células endoteliales aisladas y mantenidas en cultivo primario mostraron una rápida tasa de proliferación, empezando a crecer a partir del 5º día (5.1 ± 2.3 días) y formando una monocapa celular confluyente después de 12 días de cultivo en medios específicos (12.6 ± 5.4 días).

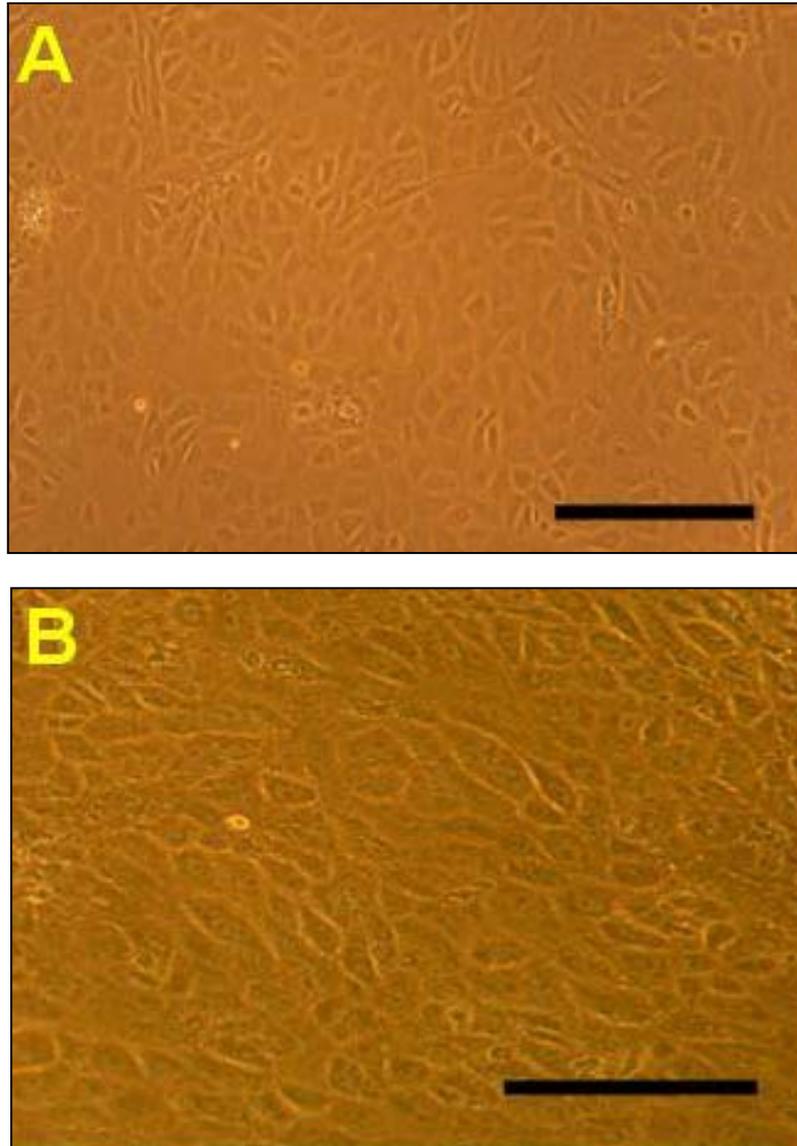


Figura 32. Imágenes de microscopía de contraste de fases del endotelio corneal cultivado del conejo de laboratorio. A: Células endoteliales correspondientes al primer subcultivo. B: Apariencia de las células a los 80 días de iniciado el cultivo (4° subcultivo). Escala: 200 μ m.

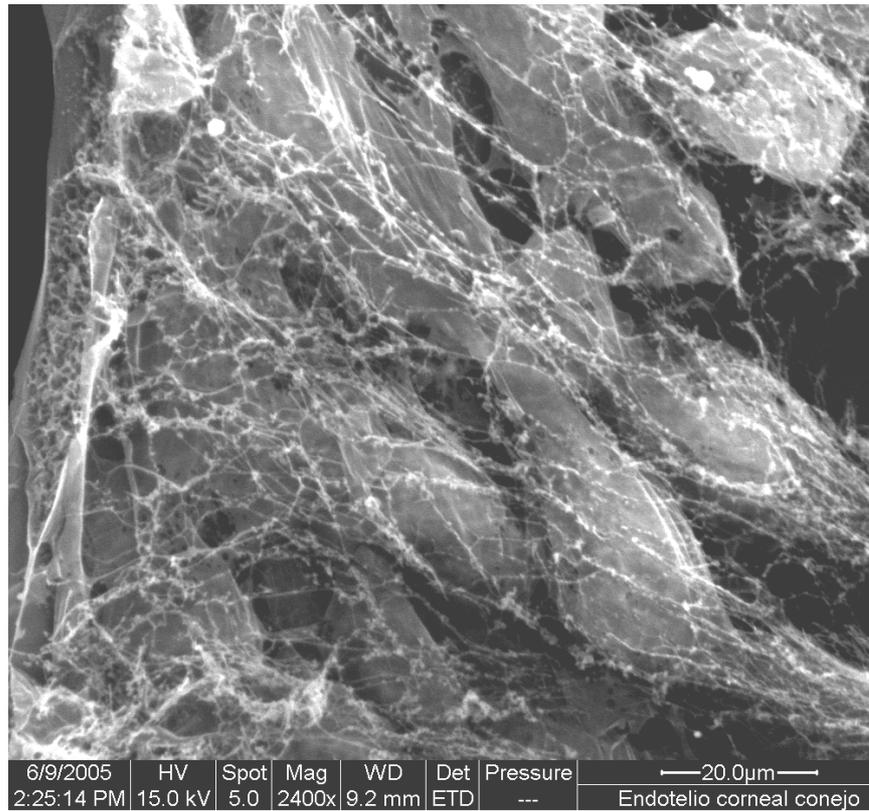


Figura 33. Fotografía obtenida mediante el microscopio electrónico de barrido de células endoteliales corneales mantenidas en cultivo. Escala: 20 µm.

2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS CORNEALES MANTENIDAS EN CULTIVOS PRIMARIOS.

La caracterización genética de los distintos cultivos celulares demostró que la expresión de ciertos genes quedó restringida a algunos tipos celulares y no a otros (figura 34). Por un lado, las células del epitelio corneal mostraron una elevada expresión del ARN_m correspondiente al gen *KRT12* (queratina 12), pero estas células no expresaron los genes *COL8* (colágeno tipo VIII) ni *VIM* (vimentina) por RT-PCR. Por otro lado, mediante los análisis de RT-PCR se comprobó que los queratocitos corneales no expresaban el ARN_m específico para los genes *KRT12* ni *COL8*, pero en cambio expresaban altas cantidades del ARN correspondiente a la vimentina *VIM*. Finalmente, las células endoteliales cultivadas mostraron una elevada expresión del gen *COL8*, mientras que los genes *KRT12* y *VIM* no se expresaron en el cultivo celular. En todos los casos, se apreció un nivel de expresión similar para el gen *GAPDH*, usado como control (figura 34).

Estos resultados muestran que la expresión de los tres genes considerados (*KRT12*, *VIM* y *COL8*) es altamente específica de las células epiteliales, estromales y endoteliales de la córnea, respectivamente.

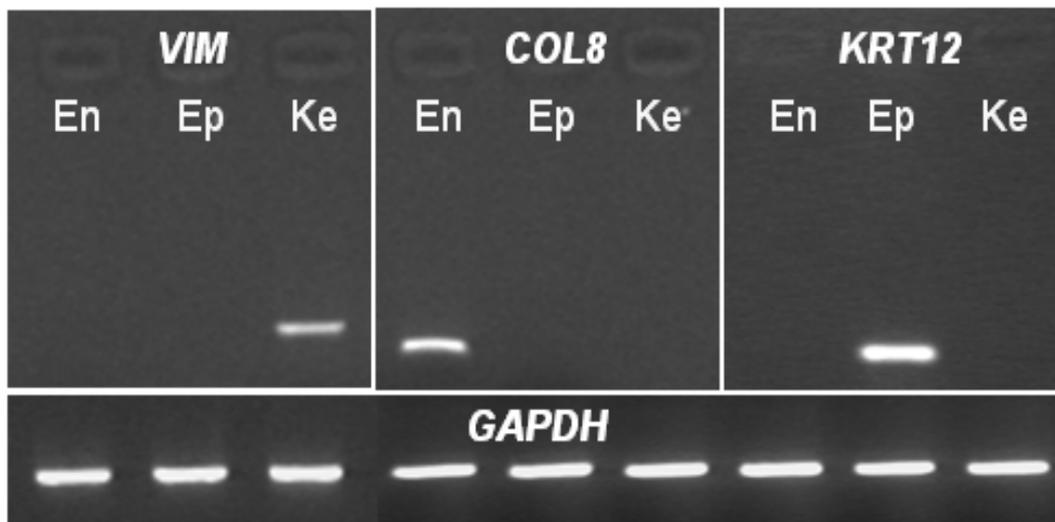


Figura 34. Análisis de expresión del ARN_m correspondiente a los genes **VIM**, **COL8** y **KRT12** en células corneales cultivadas, mediante **RT-PCR**. La expresión del gen **GAPDH** (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue usada como control de la cantidad de ARN utilizada en cada reacción. **En**: Resultados de la reacción de **RT-PCR** llevada a cabo para células endoteliales cultivadas. **Ep**: Análisis para células epiteliales. **Ke**: **RT-PCR** para queratocitos estromales

3. CONSTRUCCIÓN DE EQUIVALENTES CORNEALES DE ESPESOR COMPLETO.

En este estudio, hemos logrado construir equivalentes corneales mediante ingeniería tisular. En primer lugar, la utilización de un sistema basado en el cultivo sobre soportes porosos, logró un adecuado crecimiento y adhesión de las células endoteliales los soportes porosos, sugiriendo que los nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo cruzaron de forma efectiva la membrana y migraron hacia el compartimiento superior de los soportes porosos, donde se encontraban las células.

En segundo lugar, sobre las células endoteliales se desarrollaron los siguientes tipos de sustitutos estromales:

3.1. Sustitutos estromales fabricados con geles de agarosa al 2%.

La utilización de este tipo de material generó sustitutos estromales de adecuada consistencia y transparencia, que pudieron tallarse con facilidad para generar tejidos artificiales de tamaño y grosor adecuado (figura 35). Sin embargo, este material no permitió el crecimiento de los queratocitos en su interior, por lo que fue desechado como biomaterial para la fabricación de córneas artificiales. Del mismo modo, las células epiteliales corneales cultivadas sobre la superficie de los sustitutos estromales de agarosa pura mostraron muy bajo nivel de adherencia y un crecimiento muy escaso o nulo.

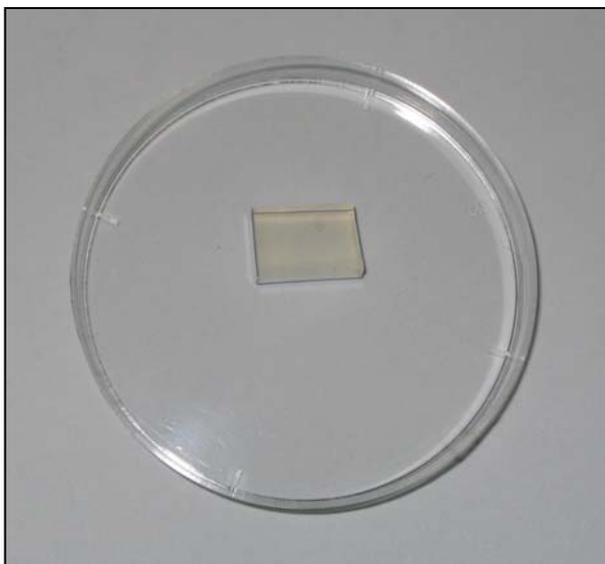


Figura 35. Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su espesor.

3.2. Sustitutos estromales fabricados con geles de fibrina humana.

La fabricación de geles de fibrina resultó técnicamente sencilla, no requiriendo la utilización de material dependiente de temperatura. Una vez solidificados, los geles de fibrina permitieron el crecimiento de los queratocitos inmersos en su espesor y de las células epiteliales sembradas en su superficie.

La consistencia de los geles de fibrina fue relativamente baja, por lo que estos geles no fueron fáciles de manejar. La transparencia de los geles de fibrina con queratocitos inmersos no fue completa, pues este material tendió a conservar el color amarillento del plasma humano (figura 36).



Figura 36. Geles de fibrina humana con queratocitos en su espesor, para ser utilizados como sustitutos estromales.

3.3. Sustitutos estromales fabricados con geles de fibrina y agarosa al 0.1%.

La generación de geles de fibrina humana a la cual se añadió agarosa hasta una concentración final del 0.1% mostró muy buenos resultados. Una vez solidificados, los geles de fibrina-agarosa presentaron una adecuada transparencia (figura 37) y una buena consistencia, lo cual facilitó el manejo y la manipulación de los geles (figura 38). Respecto a los queratocitos, estas células mostraron una buena supervivencia y proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, los queratocitos incorporados dentro de los geles de fibrina y agarosa al 0,1%, mostraron una morfología elongada o estrellada y se extendían por toda la malla estromal (figura 39). En ninguno de los casos se apreció contracción o pérdida de volumen de los geles de fibrina y agarosa después de generar los sustitutos corneales.



Figura 37. Constructo corneal fabricado a partir un sustituto estromal de fibrina y agarosa al 0,1% con queratocitos inmersos en su interior. La transparencia del constructo permite apreciar los números de la guía que sirve de referencia.



Figura 38. Sutura simple de nylon de 10/0, realizada sobre un constructo corneal fabricado a partir un sustituto estromal de fibrina y agarosa al 0,1%

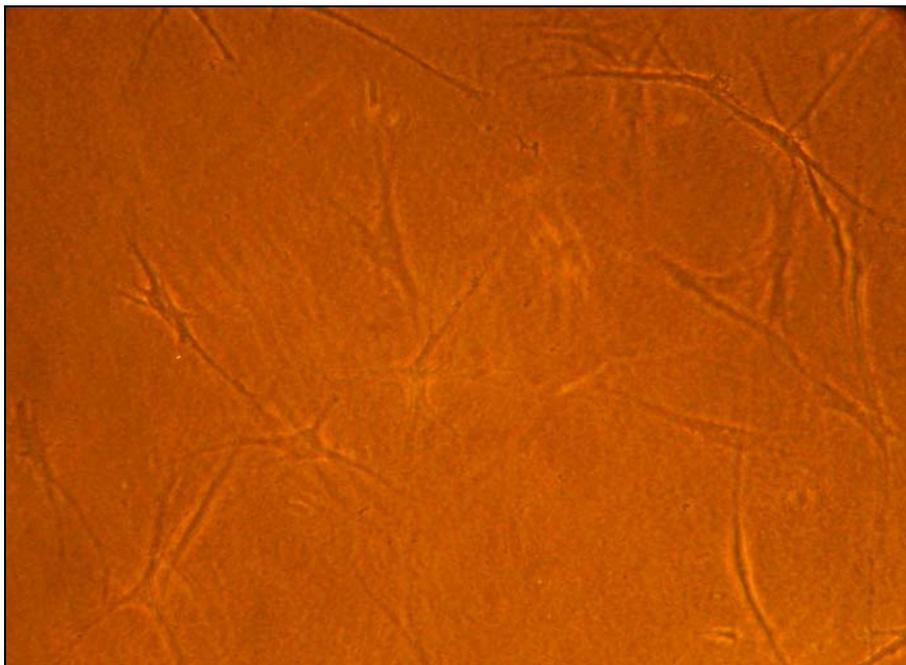


Figura 39. Queratocitos estromales inmersos en un gel de fibrina-agarosa 0,1%.

3.4. Sustitutos estromales fabricados con geles de colágeno tipo I.

La producción de geles de colágeno tipo I fue técnicamente sencilla, aunque el elevado precio del colágeno disponible comercialmente dificulta la generación de geles de gran tamaño. Una vez solidificados, los geles de colágeno tipo I presentaron varios problemas. El más importante de ellos fue la tendencia a la contracción y a la pérdida de volumen de este tipo de sustitutos estromales. Tras 7 días de cultivo con queratocitos en su interior, todos los geles de colágeno se contrajeron y perdieron entre un 25 y un 50% de su volumen original. Sin embargo, los geles de colágeno tipo I permitieron el crecimiento de queratocitos estromales en su espesor y de células epiteliales corneales en su superficie. Finalmente, los geles de colágeno tipo I fueron relativamente translúcidos (figura 40).

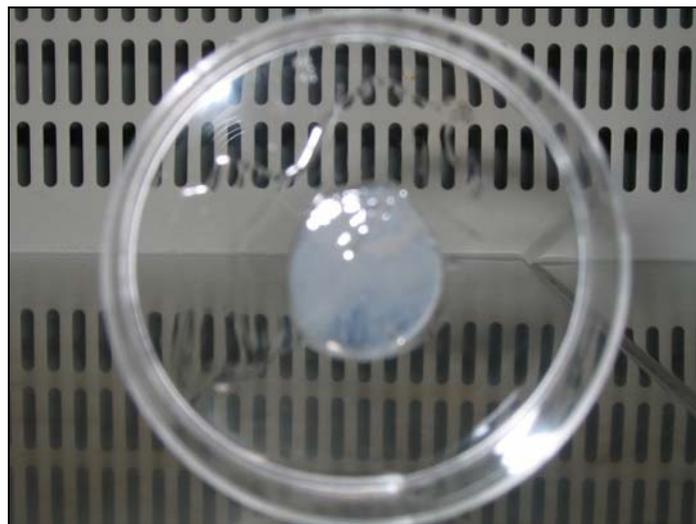


Figura 40. Equivalentes corneales de espesor completo, contruidos con sustitutos estromales a base de colágeno tipo I.

4. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EQUIVALENTES CORNEALES GENERADOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

Una vez establecida la mayor utilidad de los sustitutos estromales basados en una mezcla de fibrina y agarosa al 0,1%, se procedió a caracterizar histológicamente los constructos corneales fabricados a partir de este tipo de estroma, tal como se describe a continuación.

4.1. Los equivalentes corneales presentan un epitelio estratificado equivalente al de las córneas control.

La evaluación microscópica de los constructos corneales mediante microscopía óptica reveló la presencia de un epitelio análogo al existente en las córneas control. En el análisis inicial de las córneas mantenidas en cultivo sumergido durante dos semanas, se apreció la formación temprana de una monocapa de células epiteliales sobre el sustituto estromal. Sin embargo, después de 2 semanas de exposición de las células epiteliales al aire, empezó a observarse una estratificación progresiva del epitelio del corneal construido, formándose finalmente un epitelio estratificado muy similar al que existe en las córneas nativas del conejo de laboratorio (figura 41). Asimismo, la evaluación mediante microscopía electrónica mostró que la superficie de los constructos corneales estaba formada por una capa continua de células epiteliales que cubría por completo el sustituto estromal (figura 42).

Finalmente, el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión demostró la presencia de numerosas uniones intercelulares entre las distintas células epiteliales del constructo corneal. Entre estas uniones, destacan por su número los desmosomas (figura 43) y las uniones estrechas o *tight junctions* (figura 44), lo cual sugiere que la capa de epitelio construido formaba una barrera eficiente similar a la que existe en las córneas nativas del conejo de laboratorio. Igualmente, las células epiteliales mostraron abundantes microvellosidades en su superficie (figura 45).

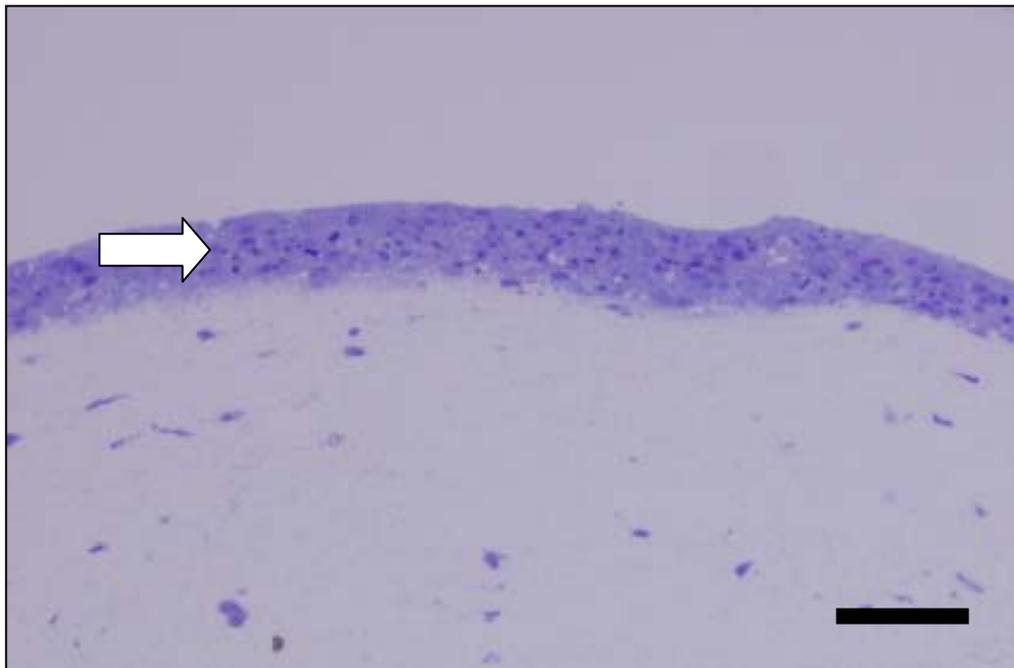


Figura 41. La evaluación mediante microscopio óptico de los constructos corneales demostró la presencia de un epitelio corneal estratificado (flecha). Tinción con azul de toluidina. Escala: 200 μm .

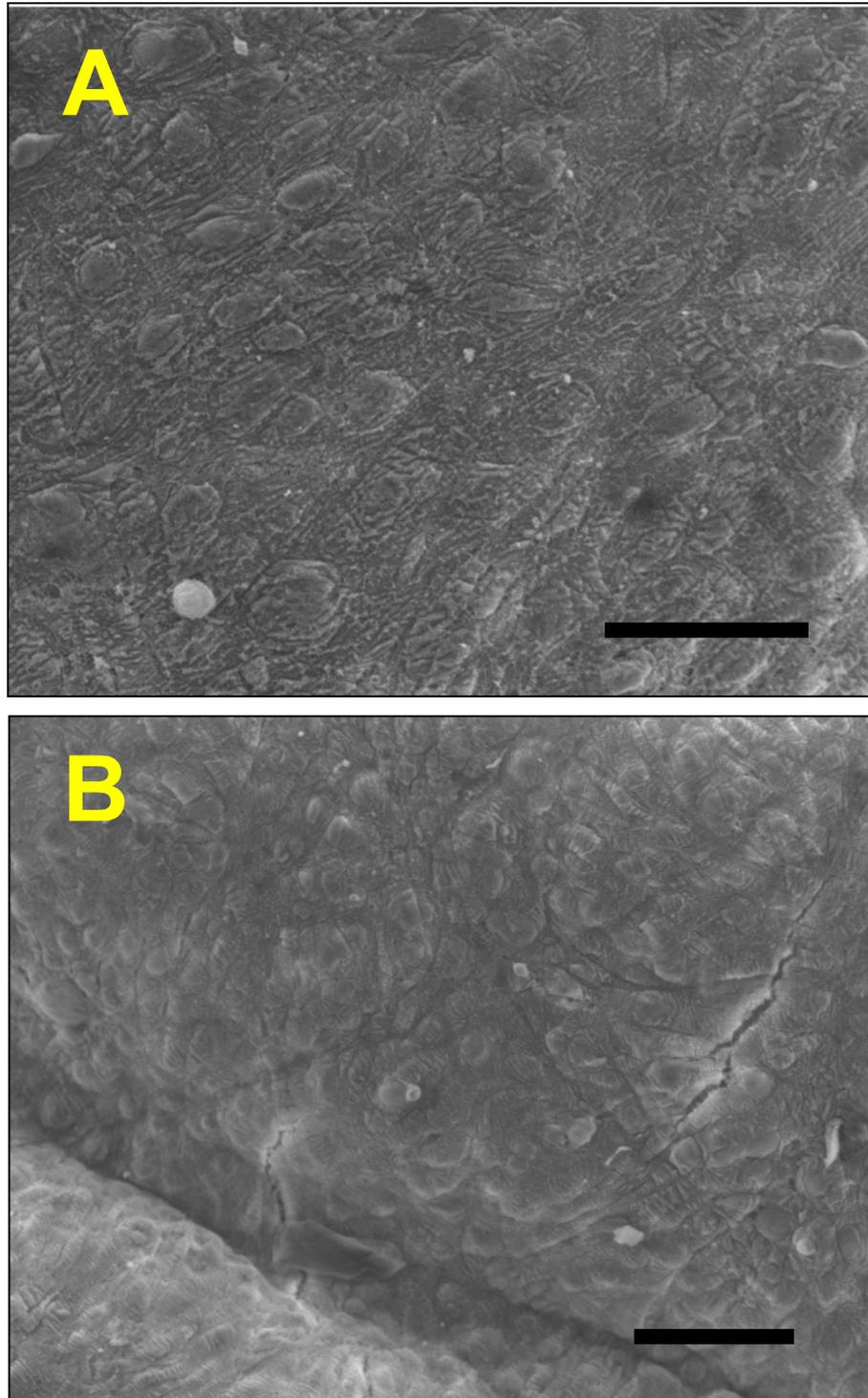


Figura 42. Superficie epitelial de los constructos corneales generados mediante ingeniería tisular. Las células epiteliales forman una capa continua de células que cubre todo el sustituto estromal tanto en A como en B. Escala: 50 μm .

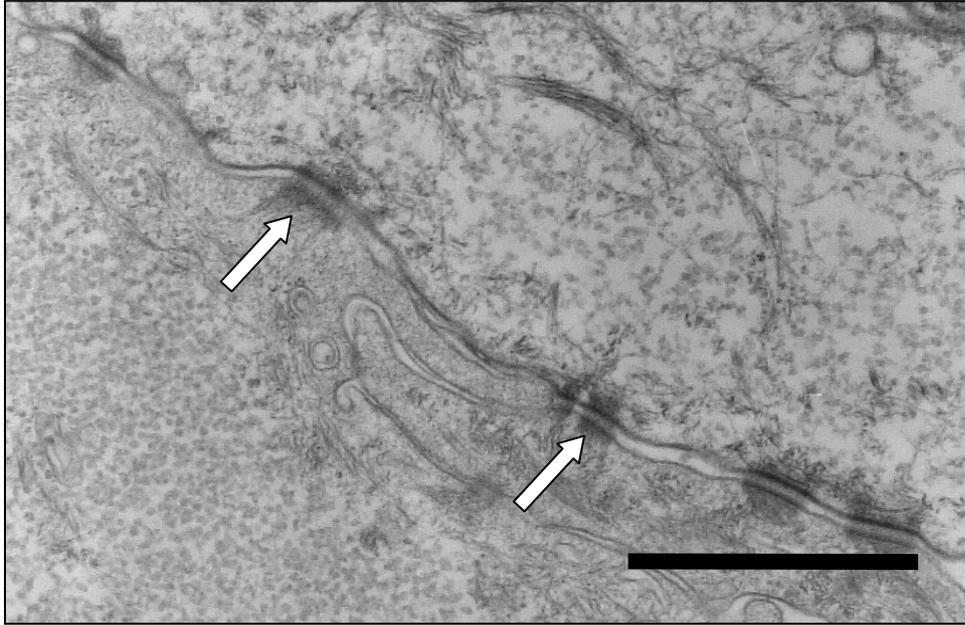


Figura 43. El análisis ultraestructural del epitelio de los constructos corneales generados mediante ingeniería tisular reveló la presencia de numerosas uniones intercelulares tipo desmosoma (flechas). Escala: 1 μ m.

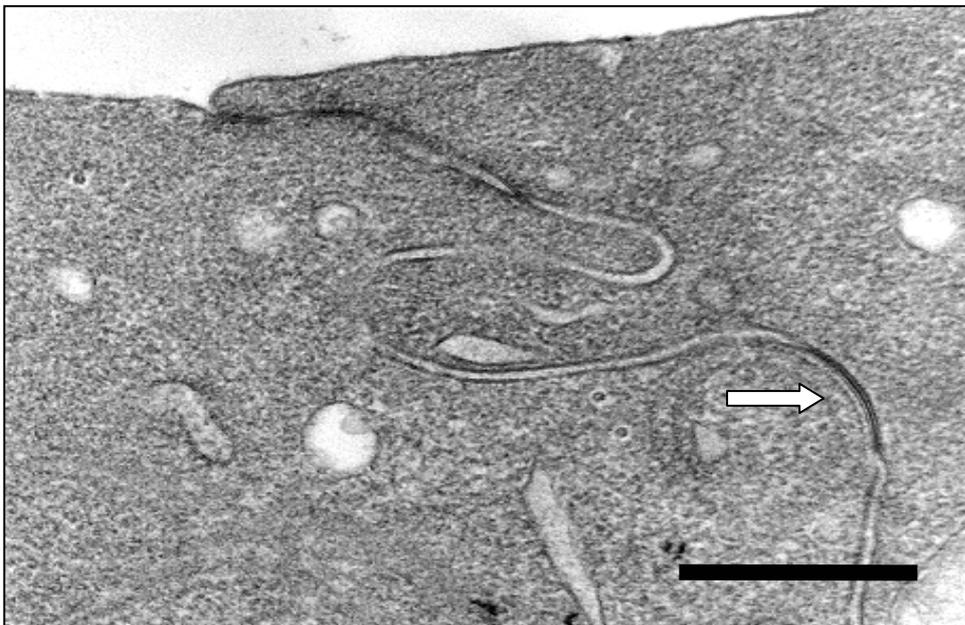


Figura 44. Unión intercelular tipo tight junction (uniones estrechas) entre las células epiteliales de los constructos corneales generados mediante ingeniería tisular (flecha). Escala: 1 μ m.

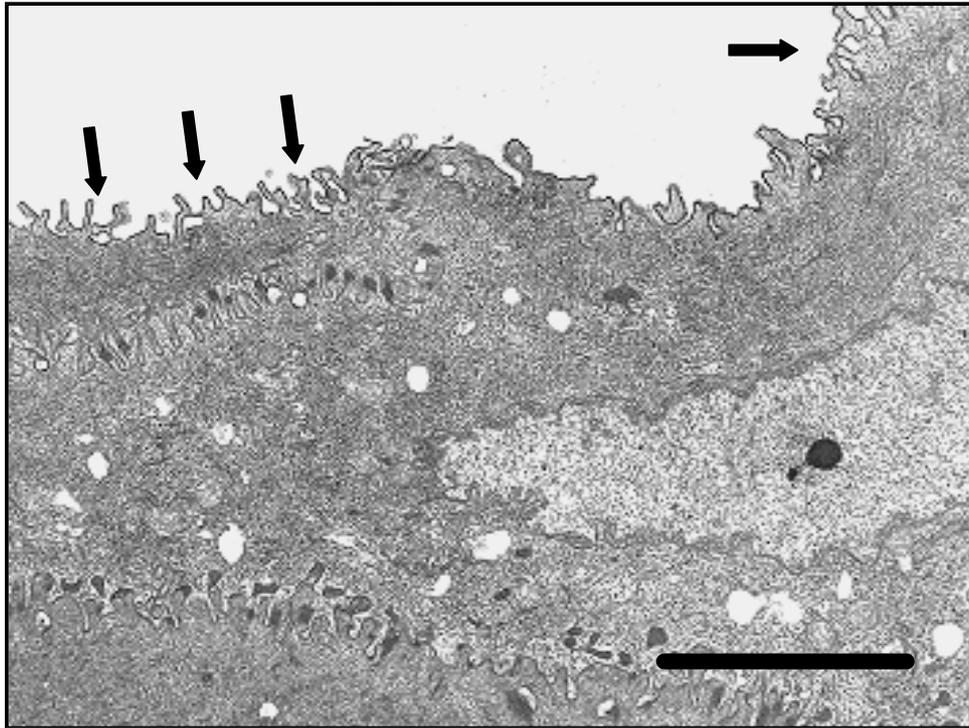


Figura 45. Presencia de microvellosidades y prolongaciones celulares en el epitelio corneal construido sobre los soportes estromales artificiales. Escala: 5 μm .

4.2. Los sustitutos estromales de fibrina y agarosa son estructuralmente análogos al estroma corneal nativo y permiten el crecimiento de los queratocitos en su interior.

La evaluación mediante microscopía electrónica de barrido de los equivalentes corneales, mostró que los sustitutos estromales fabricados a base de fibrina y agarosa 0,1% presentaban una elevada homología estructural con el estroma original de las córneas normales del conejo de laboratorio (figura 46). De igual modo, los queratocitos sembrados en el espesor de estos sustitutos estromales presentaron un adecuado crecimiento y proliferación inmersos en estas matrices (figuras 47, 48 y 49).

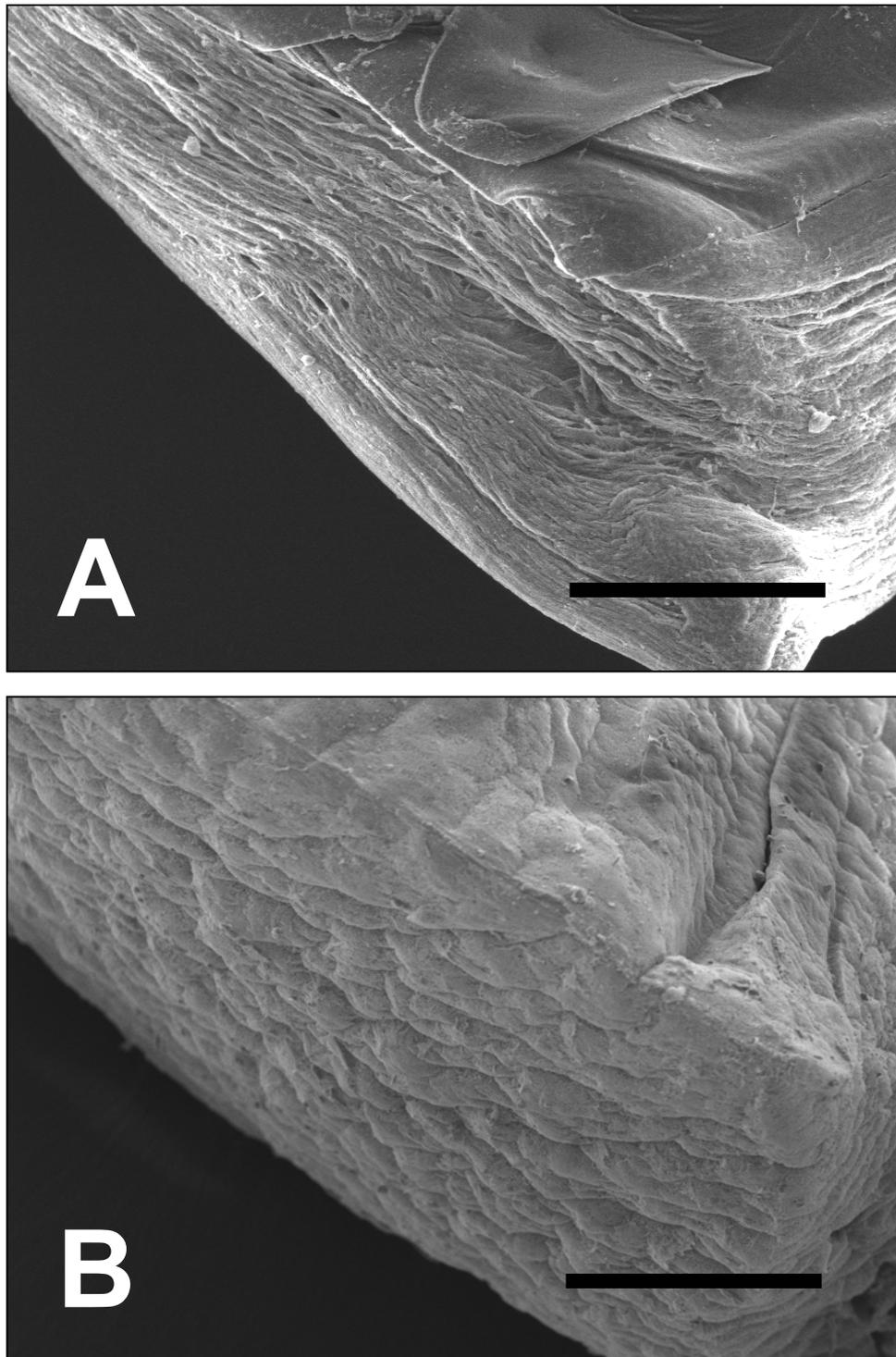


Figura 46. *Imágenes de microscopía electrónica de barrido de una córnea nativa de conejo de laboratorio y de un equivalente corneal construido por ingeniería tisular. A: Limbo esclerocorneal normal de conejo, mostrando la típica multicapa estromal. B: Equivalente corneal tridimensional construido con fibrina y agarosa 0,1% con queratocitos en su interior. Escala: 500 μ m.*

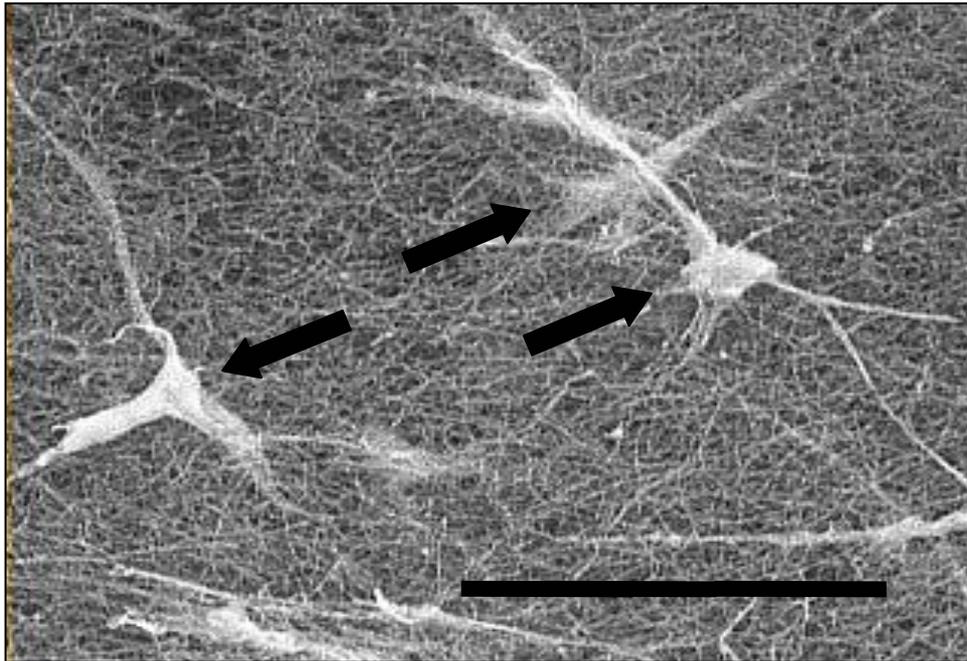


Figura 47. Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se pueden apreciar varios queratocitos (flechas) inmersos en una malla de fibras de fibrina y agarosa. Escala: 50 μm .

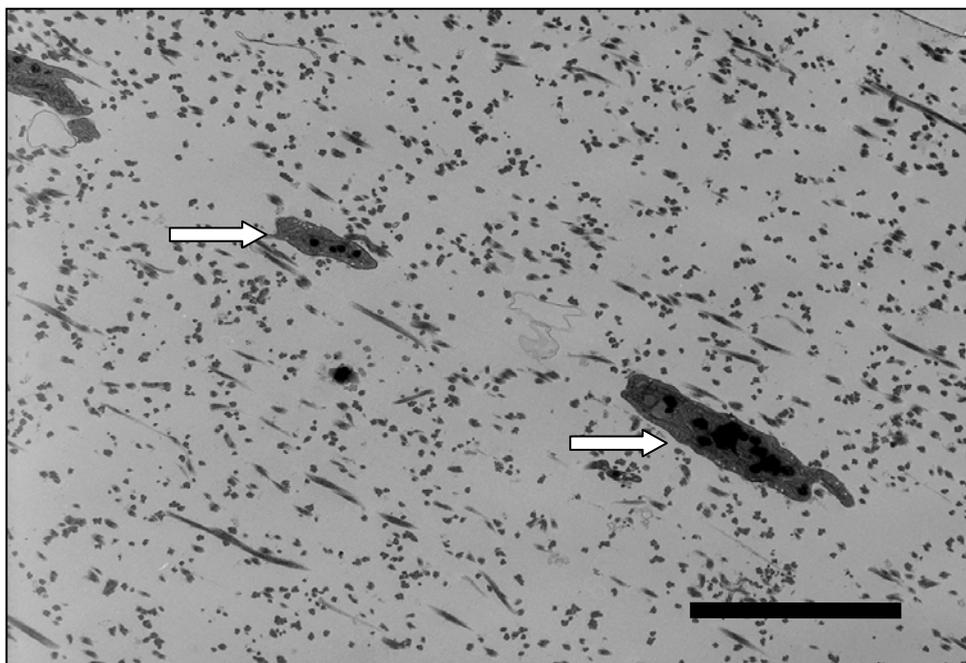


Figura 48. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se pueden apreciar varios queratocitos (flechas) inmersos en una malla de fibras de fibrina y agarosa. Escala: 50 μm .

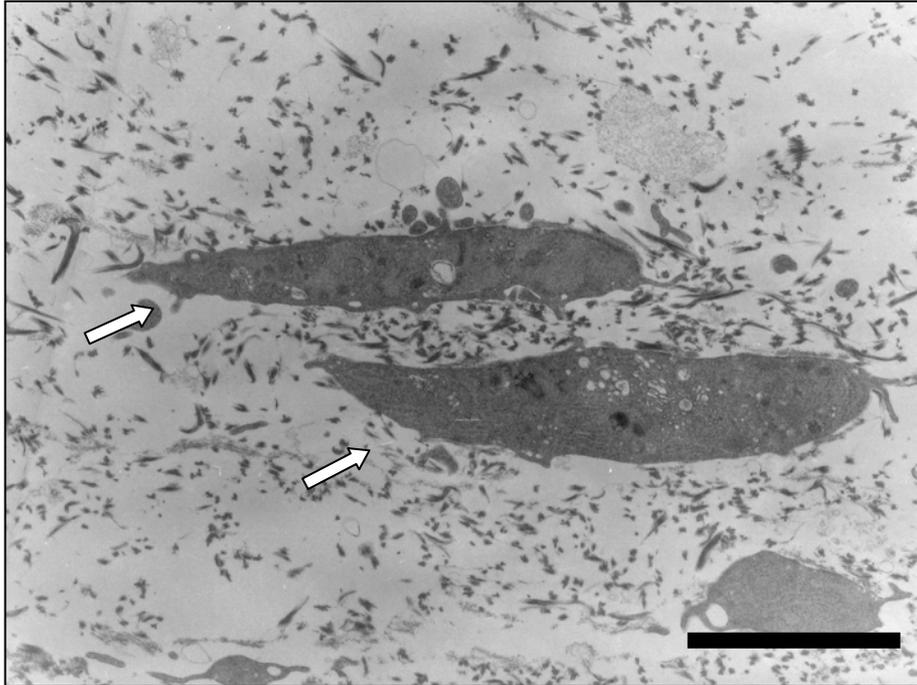


Figura 49. *Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un equivalente corneal con sustituto estromal de fibrina y agarosa al 0,1%. Pueden apreciarse dos queratocitos (flechas) en el interior de la malla estromal. Escala: 25 μ m.*

4.3. *El endotelio corneal es capaz de crecer y formar una monocapa en la base de los sustitutos estromales.*

Al igual que ocurre en las córneas nativas del conejo de laboratorio, los constructos corneales presentaron una monocapa de células endoteliales en su base (Figura 50).

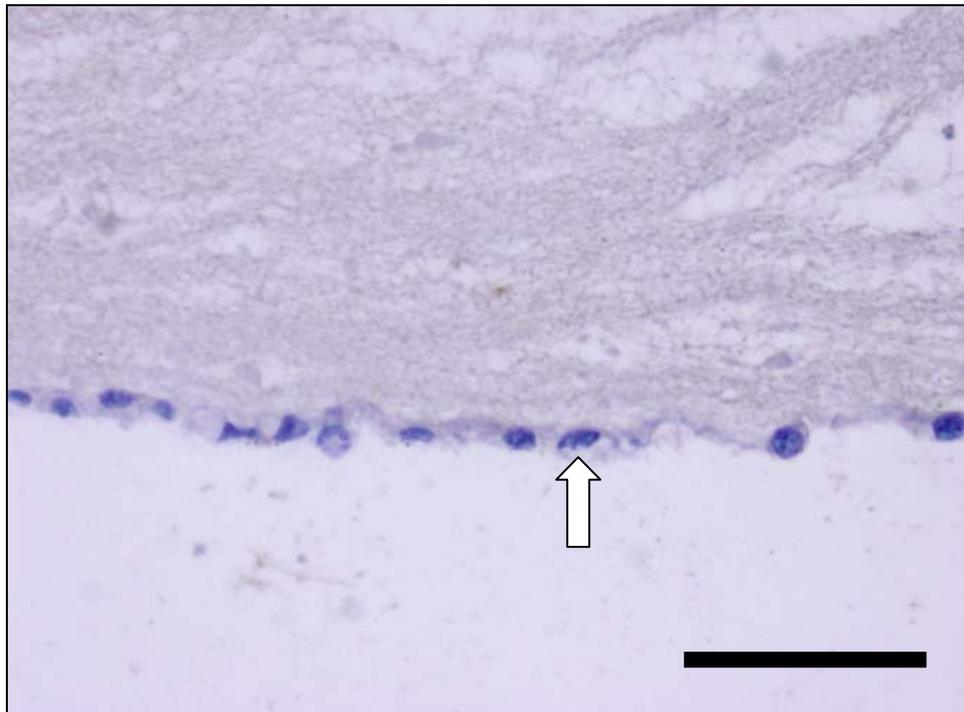


Figura 50. *La evaluación de los equivalentes corneales mediante microscopía óptica demostró la presencia de una monocapa celular de endotelio corneal en la base de los mismos (flecha). Tinción con azul de toluidina. Escala: 100 μ m.*

5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LOS EQUIVALENTES CORNEALES GENERADOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

El análisis inmunohistoquímico de los constructos corneales mostró similitudes fenotípicas de éstos con las córneas nativas de conejo. En este sentido, las córneas generadas por ingeniería tisular presentaron una expresión elevada de citoqueratina 3 en la capa celular epitelial, mientras que los queratocitos inmersos en el sustituto estromal de fibrina y agarosa mostraron una elevada expresión de vimentina (figura 51). Estos datos sugieren que tanto las células estromales como las epiteliales del constructo corneal, son biológica y funcionalmente equivalentes a las de las córneas control.

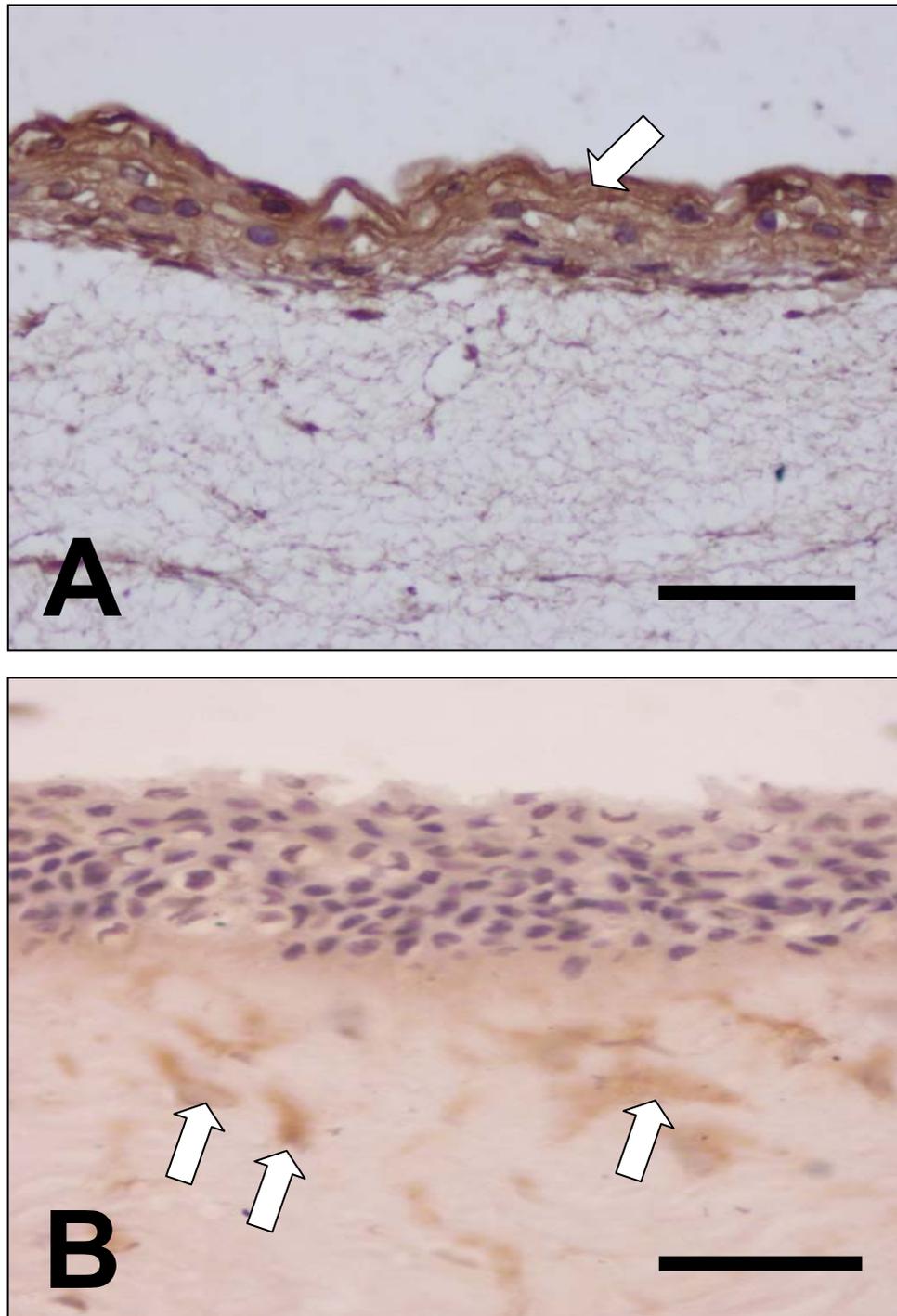


Figura 51. Análisis inmunohistoquímico de los equivalentes corneales organotípicos. A: La inmunohistoquímica para antiqueratina 3 muestra un fuerte teñido citoplásmico a nivel de la capa de epitelio biodesarrollado (flecha). B: Inmunohistoquímica para el marcador estromal vimentina. Tan solo los queratocitos estromales mostraron positividad para este marcador (flechas). Escala: 100 μ m.

DISCUSIÓN

1. ¿Por qué fabricar equivalentes corneales organotípicos?

La queratoplastia penetrante o transplante de córnea de espesor completo, es la técnica quirúrgica más utilizada en los Estados Unidos y en Europa, en el tratamiento de la patología corneal grave (Borene *et al.*, 2004). Sin embargo, esta técnica presenta varios inconvenientes de gran importancia, entre los que destacamos los siguientes:

a) Por una parte, la disponibilidad de órganos y tejidos humanos para transplante es mucho menor que la demanda actualmente existente, lo cual hace que las listas de espera para todo tipo de trasplantes, incluyendo los de córnea, sean cada vez mayores. A la insuficiencia de córneas humanas disponibles para transplante, debemos añadir la amenaza que supone en países desarrollados la continua expansión de la cirugía refractiva, dado que las córneas tratadas con este tipo de cirugía no son aptas para transplante (Ousley y Terry, 2002). En la actualidad, el número de personas sometidas a cirugía refractiva es muy elevado, y se prevé que este número pueda incrementarse de forma exponencial durante los próximos años (Lamparter *et al.*, 2005).

En países subdesarrollados, sin embargo, la disponibilidad de córneas es siempre escasa, ya sea por motivos religiosos, culturales o de infraestructura sanitaria, aunque el número de personas sometidas a cirugía refractiva es muy bajo.

b) Por otra parte, las complicaciones más graves de la queratoplastia son las derivadas del origen heterólogo de los implantes corneales, destacando por su frecuencia y gravedad, las reacciones inmunológicas frente al injerto que pueden provocar el rechazo del mismo. Este rechazo inmunológico se produce por una reacción inmune dirigida contra los aloantígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA) presente en las tres estirpes celulares de la córnea:

rechazo epitelial, rechazo frente a los queratocitos estromales y, sobre todo, rechazo endotelial. Este último constituye el tipo más grave de rechazo corneal, dado que conduce a una pérdida de células endoteliales que, al ser irreversible dada la baja tasa de proliferación de estas células, puede conducir a un edema irreversible del injerto (Coster y Willians, 2005).

c) Finalmente, a pesar de los protocolos existentes en los Bancos de Tejidos y Órganos, la utilización de órganos y tejidos heterólogos presenta el riesgo de transmisión de enfermedades desde el donante hasta el receptor. En especial, en el trasplante de córnea existe el riesgo de transmisión de: *Virus de la Inmunodeficiencia Humana*, *Virus de la Hepatitis B* (Hoft *et al.*, 1997) y *C, Virus del Herpes Simple* (Robert *et al.*, 2005), *Virus de la Rabia* (Houff *et al.*, 1999), priones (enfermedad de Creutzfeld-Jakob) (Heckmann *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 1999; Uchiyama *et al.*, 1994), bacterias acantonadas en la córnea así como algunos tumores (Mc George *et al.*, 2002) y enfermedades intrínsecas de la córnea como distrofias corneales en etapas iniciales.

La posibilidad de obtener tejidos de procedencia autóloga, generados a partir de células extraídas del propio paciente, evitaría la dependencia de órganos procedentes de donantes (y con ello, las listas de espera), así como el rechazo inmunológico (por tratarse de órganos inmunológicamente idénticos a los del receptor) y estaría exenta de la posibilidad de transmitir enfermedades desde el donante hacia el receptor. Se trataría, por tanto, de órganos generados en el laboratorio a partir de pequeñas muestras de biopsia e inmunológicamente iguales al organismo receptor.

Todo esto hace necesario el desarrollo de nuevos métodos para la reconstrucción corneal mediante la utilización de tejidos corneales autólogos (Nishida, 2003; Borene *et al.*, 2004). Como consecuencia, el implante de

equivalentes corneales biológicos desarrollados por ingeniería tisular y de queratoprótesis sintéticas, ha sido propuesto como una alternativa a la queratoplastia penetrante a la hora de restaurar la agudeza visual o la estructura corneal perdidas (Bleckmann y Holak, 2005). Por esto, la ingeniería tisular de la córnea representa un importante punto de inflexión en el tratamiento quirúrgico de la patología corneal, sin las desventajas del transplante de córnea (Nishida, 2003). En este sentido, diferentes grupos de investigación están actualmente centrados en el desarrollo de un sustituto corneal biológico (Griffith *et al.*, 1999; Minami *et al.*, 1993; Orwin y Hubel, 2000; Reichl y Muller-Goymann, 2003; Schneider *et al.*, 1999; Zieske *et al.*, 1994).

Por otra parte, en la actualidad, la experimentación con animales está amenazada por los grupos ecologistas y sociedades protectoras de animales, por lo que pensamos que un equivalente de la córnea del conejo podría ser utilizado para llevar a cabo diversos tipos de estudios sin necesidad de utilizar animales vivos. En especial, las córneas generadas en laboratorio podrían utilizarse para la realización de estudios fisiológicos o farmacológicos de la córnea o de penetración de fármacos dentro de los tejidos oculares, como ya ha sido propuesto por algunos autores (Reichl, 2003 y 2004; Tegtmeyer, 2001). En esta línea, ya han sido desarrollados diferentes modelos de cultivos celulares que tratan de reconstruir *in vitro* las diferentes barreras oculares (Honorf, 2005), los cuales podrían ser fácilmente reproducidos en nuestro modelo de equivalente corneal.

Desde hace más de quince años, numerosas directrices de la Unión Europea se han centrado sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, haciendo especial hincapié en lo referente a la búsqueda de sistemas biológicos *in vitro* que sustituyan a la experimentación con animales vivos (resoluciones 86/C331/02, DOCE L222 24/08/1999, DOCE L44

20/02/1990, DOUE L230 16/09/2003 y DOUE L198 6/08/2003 de la UE). En este sentido, nuestro modelo de córnea de conejo sintetizada *in vitro* estaría plenamente incardinado en la línea de trabajo impulsada por la UE.

2. Cultivo de las tres estirpes celulares de la córnea del conejo de laboratorio.

En el presente estudio, hemos conseguido aislar y mantener en cultivo las tres principales estirpes celulares de la córnea del conejo de laboratorio: células epiteliales, queratocitos estromales y células endoteliales corneales. El mantenimiento en cultivo de estas células procedentes de la córnea del conejo presenta una gran utilidad potencial, no sólo para su utilización en la construcción de córneas biológicas organotípicas mediante ingeniería tisular, sino además, para multitud de estudios *in vitro* centrados en la biología celular de la córnea, ensayos farmacológicos y fisiológicos, etc. La disponibilidad de células corneales cultivadas en laboratorio abre nuevos campos de investigación relacionados con el tratamiento de la patología de la superficie ocular, incluyendo implantes de células expandidas *ex vivo* con o sin la utilización de soportes de membrana amniótica (Kim *et al.*, 2005; Koizumi *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004), etc...

2.1. Cultivo de células de endotelio corneal.

Las células de epitelio corneal y estroma corneal, animales y humanas, han sido previamente cultivadas con éxito. Sin embargo, observaciones *in vivo* y *ex vivo*, además de estudios de cultivos tisulares, sugieren que la capacidad proliferativa relativa de las células de endotelio corneal podría ser diferente entre distintas especies de la escala zoológica. Por ejemplo, las células de endotelio corneal bovino, de rata y de conejo (Raymond *et al.*, 1986; Joyce, 2003) presentan

una elevada tasa de proliferación en cultivo, pudiendo generar un gran número de células a partir de pequeñas biopsias de tejido original. Conforme a los resultados de estos investigadores, nuestro grupo de investigación ha sido capaz de cultivar con éxito las células del endotelio corneal del conejo y de utilizarlas para la generación de córneas en laboratorio mediante ingeniería tisular. Sin embargo, aunque algunos autores informaron de éxito en el cultivo de endotelio corneal humano (Joyce, 2003; Sumide *et al.*, 2006), es bien conocido que las células de endotelio corneal del mono y del hombre muestran un índice de proliferación muy bajo, siendo por tanto, muy difíciles de mantener en cultivo (Joyce, 2003). Por esta razón, ningún grupo de investigación ha sido capaz de desarrollar un modelo biológico de córnea utilizando células humanas normales de las tres estirpes celulares. De hecho, el único constructo corneal fabricado con células corneales humanas de las tres principales estirpes de la córnea, ha utilizado células endoteliales inmortalizadas mediante el virus SV40 (Griffith *et al.*, 1999). El uso de células manipuladas genéticamente, sin embargo, está altamente restringido a ciertos propósitos no clínicos, pues el índice de proliferación de esas células es mucho mayor que el de las células nativas (Engelmann, 2004). La inmortalización celular constituye un proceso muy complejo y no bien conocido que, muy probablemente, desemboca en la transformación maligna de las células inmortalizadas en un plazo muy corto de tiempo. La utilización clínica de células premalignas está formalmente prohibida por la legislación y se aleja de los principios éticos que han de regir la práctica de los ensayos clínicos con seres humanos.

2.2. Cultivo de células corneales estromales.

Respecto a las células del estroma corneal, nuestros cultivos de queratocitos demostraron una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medios de cultivo exentos de factores de crecimiento. Estos resultados coinciden con los datos publicados por otros investigadores (Orwin y Hubel, 2000; Teixeira *et al.*, 2004).

2.3. Cultivo de células de epitelio corneal.

En referencia a los cultivos de células epiteliales corneales, la técnica 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.

Por otro lado, 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 (Germain *et al.*, 2000; Talbot *et al.*, 2006). 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.

2.4. *Identificación de células corneales mediante análisis de expresión de genes con RT-PCR.*

En este contexto, es muy importante identificar apropiadamente los diferentes tipos celulares que se mantienen en cultivo. Tras el aislamiento y el cultivo, la mayoría de las células tienden a experimentar cierto grado de indiferenciación fenotípica, lo cual hace que a veces sean difíciles de identificar mediante la simple evaluación morfológica. No obstante, los análisis de expresión de determinados genes mediante RT-PCR son muy específicos de cada tipo celular, constituyendo además muy buenos marcadores para identificar las diferentes células corneales (Rabinowitz, 2005). En este estudio, los análisis de expresión llevados a cabo por RT-PCR demostraron que las células de endotelio corneal mantenidas en cultivo expresaban niveles elevados del ARN_m específico para el gen *COL8*, el cual codifica para el colágeno tipo VIII, constituyente fundamental y específico de la membrana de Descemet. La expresión del gen *COL8* en células no endoteliales es muy baja, por lo que este marcador puede ser utilizado para la identificación genética específica de las células endoteliales de la córnea (Chen *et al.*, 2002; Sawada *et al.*, 1990; Biswas *et al.*, 2001; Fujimaki *et al.*, 1999; Burgeson *et al.*, 1988; Kapoor *et al.*, 1988). Numerosos trabajos han demostrado previamente que la expresión del colágeno tipo VIII está restringida a la membrana de Descemet de la córnea y que solamente las células que expresan altos niveles de expresión del gen *COL8* pueden considerarse células endoteliales (Biswas *et al.*, 2001; Burgeson *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2002; Fujimaki *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 1988; Sawada *et al.*, 1990).

Por otro lado, las células epiteliales corneales mostraron una elevada expresión del gen que codifica para queratina 12 (gen *KER12*), mientras que los queratocitos estromales no expresaron los ARN_m correspondientes a colágeno VIII

ni a queratina 12, pero mostraron una alta expresión del gen *VIM*. El gen *VIM* codifica para la vimentina, proteína muy abundante en el citoesqueleto de los fibroblastos, los queratocitos y otros tipos de células estromales y del tejido conjuntivo. Por otra parte, la expresión de los genes que codifican las citoqueratinas 3/12 es un marcador bien establecido de diferenciación de epitelio corneal (Chen *et al.*, 2002; Koizumi *et al.*, 2002; Kurpakus *et al.*, 1990; Nishida *et al.*, 2004; Rabinowitz *et al.*, 2005).

Estas u otras técnicas altamente específicas, serían muy apropiadas para su uso con células que van a ser utilizadas en la construcción de órganos por ingeniería tisular. De este modo, el investigador puede asegurar que las células que utilizará para la generación de córneas en el laboratorio corresponden a las tres principales estirpes celulares de la córnea.

3. Construcción de equivalentes corneales de la córnea del conejo de laboratorio.

3.1. Técnica secuencial de cultivo, utilizando sustitutos estromales.

Una vez que las células corneales de epitelio, estroma y endotelio han sido aisladas y cultivadas, usamos una técnica secuencial de cultivo para desarrollar un sustituto eficaz de la córnea del conejo. Para la construcción de equivalentes corneales organotípicos, utilizamos soportes porosos para cultivo celular disponibles comercialmente (Reichl y Muller-Goymann, 2003). Este sistema se utilizó por dos motivos:

a) Por una parte, la presencia de una membrana porosa en la base de cada soporte permite el cultivo de una capa de células endoteliales en el fondo de los

constructos sin comprometer el aporte de oxígeno y nutrientes a esas células. De otro modo, las células endoteliales cultivadas en la base de un sustituto estromal nunca estarían en contacto directo con el medio de cultivo y, por tanto, podrían estar sometidas a estrictas condiciones de anoxia que se impedirían su desarrollo (Reichl y Muller-Goymann, 2003). En nuestro caso, la evaluación con microscopía electrónica de los equivalentes corneales desarrollados con esta técnica secuencial, mostraron que una monocapa celular confluyente de células endoteliales viables, se formó sobre la cara posterior de los sustitutos estromales.

b) Por otra parte, la utilización de este tipo de soportes porosos para cultivo celular nos permitió utilizar una técnica de cultivo aire-líquido para promover la estratificación de las capas más superficiales de epitelio. Algunos cultivos con soportes porosos han sido utilizados por diferentes investigadores para la construcción de varios tipos de tejidos mediante ingeniería tisular (Geroski *et al.*, 1992; Hutak *et al.*, 2002; Limat *et al.*, 2003; Reichl, y Muller-Goymann, 2003; Richard *et al.*, 1991), como una forma eficaz de promover la estratificación del epitelio corneal (Chang *et al.*, 2000; Kawazu *et al.*, 1998 y 1999; Richard *et al.*, 1991). La generación de córneas con un epitelio estratificado presenta enormes ventajas desde un punto de vista funcional. Como se expuso en la introducción de este estudio, la córnea normal presenta varias capas de células epiteliales, lo cual confiere a la córnea gran parte de sus propiedades, incluyendo la regulación de los niveles de agua que se pierden hacia el exterior y la capacidad de barrera frente a agentes externos.

3.2. Desarrollo de sustitutos estromales.

En general, las propiedades de los tejidos biológicos nativos son muy difíciles de reproducir utilizando materiales sintéticos. A diferencia de los geles de

polímeros simples, muchos materiales biológicos como la córnea, pueden incrementar su dureza y consistencia cuando las condiciones del medio así lo requieren. De ese modo, la córnea puede prevenir deformaciones que podrían amenazar la integridad del tejido (Storm *et al.*, 2005).

En este estudio se han utilizado los siguientes sustitutos estromales:

3.2.1. Modelos de equivalentes corneales contruidos con un sustituto estromal a base de agarosa 2%.

Aunque la agarosa constituye un buen candidato para la fabricación de sustitutos estromales transparentes y de adecuada consistencia, este material no permitió el crecimiento de los queratocitos en su interior, por lo que fue desechado como biomaterial para la fabricación de equivalentes corneales.

3.2.2. Sustitutos estromales a base de fibrina humana.

Algunos investigadores han propuesto la utilización de matrices de fibrina como sustitutos estromales en diferentes tejidos, incluyendo la córnea humana (Han *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2006). Sin embargo, las propiedades mecánicas de los geles de polímeros de fibrina pura no son siempre comparables a los del estroma corneal en términos de consistencia y transparencia, aunque tienen la ventaja de su amplia disponibilidad y la ausencia de contracción cuando son mantenidos en cultivo.

Todo esto concuerda con nuestros resultados, nuestros geles de fibrina permitieron el crecimiento celular, no tendieron a la contracción, pero su transparencia no fue perfecta.

3.2.3. *Equivalente corneal construido con un sustituto estromal a base de fibrina y agarosa al 0.1%.*

En este estudio, hemos construido un sustituto estromal utilizando para ello un gel de fibrina y agarosa al 0.1%, con queratocitos estromales inmersos en su interior. Estos constructos demostraron mejor consistencia que los fabricados únicamente con fibrina, una buena transparencia y nos permitieron llevar a cabo suturas sobre ellos. Además, los geles de fibrina y agarosa fueron capaces de sostener una capa funcional de epitelio, similar al epitelio corneal normal, donde todas las células mostraron una apropiada unión y crecimiento sobre la matriz estromal. Además, los geles de fibrina y agarosa no tendieron a la contracción, como ocurría con los geles de colágeno de acuerdo con trabajos previos (Nishida *et al.*, 2004), y su apariencia microscópica fue muy similar a córneas nativas. Como ya hemos dicho, la capa superficial de células epiteliales de epitelio corneal aparecía aplanada, con numerosos desmosomas y uniones estrechas, como es el caso de las córneas normales *in vivo* (Reichl *et al.*, 2004; Toropainen *et al.*, 2001). Todos esos resultados sugieren que el epitelio corneal desarrollado por ingeniería tisular forma una barrera estrecha y, por eso, los constructos corneales podrían ser utilizados como un sustituto eficaz de la córnea nativa para propósitos *in vivo* o *in vitro* o para estudios farmacológicos (Ebertz, y McGann, 2004; Hornof *et al.*, 2005; Kawazu *et al.*, 1998; Reichl *et al.*, 2004; Tegtmeyer *et al.*, 2001; Toropainen *et al.*, 2001). Además, los análisis de expresión de proteínas llevados a cabo sobre los constructos corneales, demostraron una alta expresión de la citoqueratina 3 en el epitelio corneal cultivado y una expresión específica de vimentina restringida a las células estromales. Estos análisis son altamente específicos e implican que la expresión proteica y la estructura histológica de los constructos corneales son equivalentes a las córneas originales.

Nuestros hallazgos sugieren que los sustitutos corneales basados en matrices de fibrina y agarosa, son equivalentes a las córneas del conejo, asemejando la ultraestructura de un órgano normal. Los complejos de fibrina-agarosa descritos en este estudio parecen satisfacer los criterios para biomateriales usados para ingeniería tisular de la córnea, siendo muy simples de fabricar, y probablemente, bien tolerados cuando se implanten en animales de laboratorio. Por estas razones, creemos que el desarrollo de una cornea de espesor completo en laboratorio es posible y ofrece nuevos y extensos campos de investigación. Constructos basados en células corneales de conejo serían una barrera ideal para la investigación *in vitro* de permeabilidad de fármacos, cuando córneas extirpadas no están disponibles para este propósito (Tegtmeyer *et al.*, 2001).

3.2.4. Modelos de equivalentes corneales contruidos con un sustituto estromal a base de colágeno tipo I.

Varios modelos de tejido corneal han sido producidos *in vitro* usando células animales. Zieske y colaboradores (1994), informaron de un método para desarrollar equivalentes corneales incluyendo queratocitos estromales inmersos en un gel de colágeno con o sin una capa de células inmortalizadas de endotelio corneal de ratón. Una de las principales dificultades del uso de sustitutos estromales de colágeno tipo I es el elevado coste de este tipo de material y su escasa disponibilidad. Por otro lado, los geles de colágeno tienden a perder volumen y contraerse con el tiempo, por lo que el volumen final del órgano construido puede ser muy diferente del volumen originalmente previsto. Otro modelo corneal que utilizaba las tres estirpes celulares de la córnea bovina sobre matrices de colágeno fue propuesto por Minami y colaboradores (1993), mientras que Schneider y colaboradores (1999), desarrollaron un constructo corneal usando las tres capas

celulares de la córnea fetal del cerdo. En los tres casos referidos, el uso de geles de colágeno estuvo dificultado por la contracción del gel mediada por los queratocitos (Reich *et al.*, 2004; Germain *et al.*, 2000).

Todo esto concuerda con nuestros resultados, nuestros geles de colágeno tendieron a contraerse tras 7 días de cultivo con queratocitos, aunque permitieron el crecimiento de células epiteliales y queratocitos y consiguieron una buena transparencia.

4. Problemas pendientes de solucionar. Retos para el futuro.

4.1. Cultivo de endotelio humano.

Uno de los principales objetivos de la ingeniería tisular de la córnea es construir un equivalente biológico de la córnea humana a partir de pequeños fragmentos biopsiados de la córnea. Sin embargo, el desarrollo de equivalentes corneales de espesor completo a partir de explantes limbales tiene la dificultad de la incapacidad de endotelio corneal humano para crecer a partir de pequeños fragmentos de biopsia corneal. Por esto, nuestro modelo de cornea organotípica en conejos podría ser muy útil para todo tipo de experimentos *in vitro* de las propiedades biológicas de la córnea (Ebertz, y McGann, 2004; Kawazu *et al.*, 1998; Hornof *et al.*, 2005; Reichl *et al.*, 2004; Tegtmeier *et al.*, 2001; Toropainen *et al.*, 2001). Para fabricar un equivalente corneal autólogo humano, podemos obtener epitelio corneal y queratocitos estromales a partir de biopsias de limbo esclerocorneal del paciente, pero la obtención de endotelio corneal autólogo es un reto para el futuro. Aunque algunos autores (Joyce 2003; Sumide *et al.*, 2006) refieren haber conseguido cultivar endotelio corneal humano procedente de córneas

de pacientes jóvenes, la mayoría de los investigadores han sido incapaces de cultivar dichas células con éxito. Por otra parte, el enorme potencial que presentan las células madre adultas que existen en el tejido adiposo y en la médula ósea humanas (De Ugarte *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002) podría abrir nuevos campos de investigación referentes a la generación de células endoteliales corneales humanas en laboratorio. De hecho, estas células madre adultas ya han sido transdiferenciadas en laboratorio hacia varias estirpes celulares como hueso (Hicok *et al.*, 1998), cartílago (Nathan *et al.*, 2003), músculo estriado (Bacou *et al.*, 2004), músculo cardíaco (Planat-Benard *et al.*, 2004), endotelio vascular (Miranville *et al.*, 2004) o neuronas (Dezawa *et al.*, 2004). La enorme plasticidad de estas células madre nos permite ser optimistas respecto a que en el futuro, puedan transdiferenciarse hacia células de endotelio corneal, por lo que pensamos que pueden tener un papel muy importante en el próximo desarrollo de la ingeniería tisular de la córnea.

4.2. Inervación de los equivalentes corneales.

El efecto trófico de la inervación puede tener un papel importante en la estabilización a largo plazo del equivalente corneal implantado. La administración tópica del factor de desarrollo neuronal (*Nerve Growth Factor*) ha demostrado que promueve la inervación corneal en queratitis neurotróficas (Bonini *et al.*, 2000; Lambiase *et al.*, 1998) y acelera la reinervación corneal post LASIK (Myung-Jin *et al.*, 2004), por lo que sería interesante estudiar su utilización en equivalentes corneales implantados, como estímulo para la inervación de estos constructos.

4.3. Mejorar la consistencia para una adecuada manipulación quirúrgica.

Aunque la consistencia de nuestros equivalentes corneales nos permitió practicar suturas simples sobre los mismos, todavía debe mejorarse para poder realizar una óptima implantación quirúrgica, por lo tanto aún es necesario profundizar en la búsqueda de nuevos sustitutos estromales que, permitiendo el crecimiento de células en su interior y en sus superficies, sean adecuados para su manipulación quirúrgica y presenten una consistencia y resistencia similares a las de la córnea humana.

4.4. Mejorar la transparencia y capacidad refractiva de los equivalentes corneales.

Para lograr el objetivo funcional final de una buena agudeza visual en los pacientes en los cuales se van a implantar estas córneas generadas en el laboratorio, éstas deben tener una transparencia y una capacidad refractiva adecuadas. Perfeccionar las superficies de cultivo celular para adoptar una forma adecuada en los constructos corneales nos permitiría obtener equivalentes corneales lo más parecidos posibles a las córneas nativas. Por otro lado, el desarrollo de nuevas matrices extracelulares contribuiría a mejorar la transparencia de los constructos.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, pueden emitirse las siguientes conclusiones:

1.- En relación con los cultivos celulares de las tres principales estirpes celulares de la córnea del conejo de laboratorio:

Los tres tipos principales de células de la córnea (células epiteliales, queratocitos y células endoteliales corneales) mostraron un adecuado nivel de proliferación en cultivo, lo cual nos permitió establecer cultivos primarios de las tres estirpes celulares. La mayor capacidad de proliferación correspondió a la población queratocítica, seguida de la epitelial. La utilización de una capa de células alimentadoras, no se asoció a una mayor proliferación celular, aunque ayudó a evitar la contaminación del cultivo por células estromales.

2.- En relación a la identificación fenotípica de las tres principales estirpes celulares de la córnea del conejo de laboratorio mediante RT-PCR:

La caracterización de la expresión génica de los distintos cultivos celulares mediante RT-PCR demostró que la expresión de ciertos genes quedó restringida a algunos tipos celulares y no a otros. La expresión de los genes *KRT12*, *VIM* y *COL8* fue altamente específica de las células epiteliales, estromales y endoteliales de la córnea, respectivamente. Esta técnica permite asegurar que las células utilizadas en la generación de equivalentes corneales corresponden a las tres principales estirpes celulares de la córnea.

3.- En relación a la fabricación *in vitro* de sustitutos estromales.

1. Los sustitutos estromales contruidos a base de geles de agarosa al 2% mostraron una adecuada consistencia y transparencia. Sin embargo, este material no permitió el crecimiento de los queratocitos en su interior, por lo que fueron desechados.
2. Los geles de fibrina humana mostraron un buen nivel de crecimiento de los queratocitos estromales cultivados en su espesor, pero su consistencia fue relativamente baja y su transparencia no fue completa.

3. Los sustitutos estromales basados en geles mixtos de fibrina y agarosa al 0,1% fueron los que mostraron los mejores resultados, presentando una buena consistencia y una adecuada transparencia. En este tipo de sustituto estromal, los queratocitos presentaron una elevada supervivencia y un buen nivel de proliferación celular. Por estos motivos, concluimos que los geles de fibrina y agarosa constituyen un modelo ideal para la sustitución del estroma corneal.
4. Los geles de colágeno tipo I permitieron el crecimiento de queratocitos estromales en su interior y presentaron niveles adecuados de consistencia y transparencia. Sin embargo, estos hidrogeles tendieron a la contracción y a la pérdida de volumen tras 7 días de cultivo.

4.- En relación a la fabricación *in vitro* de equivalentes corneales de espesor completo.

La técnica de cultivo secuencial sobre soportes porosos demostró una gran utilidad a la hora de permitir la fabricación de equivalentes corneales organotípicos en el laboratorio. La utilización de este tipo de técnica permitió el desarrollo de sustitutos corneales con las tres principales estirpes celulares de la córnea nativa: células de epitelio corneal, queratocitos estromales y células endoteliales corneales. Las tres estirpes celulares mostraron una buena supervivencia y proliferación en los constructos, lo que unido a los sustitutos estromales de fibrina y agarosa, permite la generación de equivalentes completos de la córnea con un adecuado nivel de transparencia y consistencia.

5.- En relación a la caracterización histológica y estructural de los equivalentes corneales basados en sustitutos estromales de fibrina y agarosa.

La evaluación microscópica de los equivalentes corneales reveló la presencia de un epitelio corneal estratificado con células superficiales aplanadas, en las que existían abundantes microvellosidades y uniones intercelulares estrechas y tipo desmosoma, células de endotelio corneal en monocapa y un estroma compatible con la estructura histológica normal de la córnea del conejo.

6.- En relación a la caracterización de la expresión de proteínas específicas en las distintas capas de los equivalentes corneales.

El análisis inmunohistoquímico mostró que los equivalentes corneales presentaron una expresión elevada de citoqueratina 3 en la capa celular epitelial, mientras que los queratocitos inmersos en el sustituto estromal de fibrina y agarosa mostraron una elevada expresión de vimentina. Estos datos sugieren que tanto las células estromales como las epiteliales del equivalente corneal, son biológica y funcionalmente equivalentes a las de las córneas nativas.

7.- La aplicación de las técnicas de cultivo celular y de ingeniería tisular descritas en este estudio, nos ha permitido generar un equivalente de la córnea del conejo estructuralmente análogo a las córneas nativas de este animal. El perfeccionamiento de las técnicas utilizadas, podría permitir en el futuro la elaboración de equivalentes de la córnea humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaminos M, Marín JL, Moreno MI, Sánchez C. Perineal transsphincteric derivation of urine. Experimental study in rabbits. *Eur J Pediatr Surg.* 2004; 14: 1-8.

Assouline M. Neurophysiologie epithelial. L'épithelium cornéen. Rapport de la Soc Fr Ophthalmol. Masson, Paris, 1993 ; 28-40.

Atala, A. Tissue engineering of artificial organs. *J. Endourol* 2000; 14: 49-50.

Auger FA, López Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F and Germain L. Skin equivalent produced with human collagen. *In vitro Cell Dev* 1995; 31, 432-439.

Aufderheide AC and Athanasiou KA. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 2005; 11: 1095.

Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y and Nougues J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004; 13: 103–111.

Barber JC, Feaster FT and Priour DJ. Acceptance of atreous-carbon alloplastic material, proplast, into the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1980; 19: 182-190.

Barraquer JI. Lamellar keratoplasty. *Ann Ophthalmol* 1972; 4: 437-69.

Bell E. Deterministic models of tissue engineering. *J.Cell Eng* 1995; 1: 28-34.

Beuerman RW and Schimmeelpfennig B. Sensory denervation of the cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 1980; 69: 196-201.

Biswas S, Munier FL and Yardley J. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 2415-2423.

Blencke BA, Hagan P, Bromer H and Deurscher K. Study on the use of glass ceramics in osteo-odonto-keratoplasty. *Ophthalmologica* 1978; 176:105-112.

Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G and Aloe L. Topical treatment with Nerve Growth Factor for neurotropic keratitis. *Ophthalmology* 2000; 107: 1347-1352.

Borene ML, Barocas VH and Hubel A. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent. *Ann. Biomed Eng* 2004; 32: 274.

Burgeson, RE. New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; 4: 551-577.

Caizza S, Falcinelli G and Pintucci S. Exceptional case of bone resorption in an osteo-odontokeratoprosthesis. A scanning electron microscopy and X ray microanalysis study. *Cornea* 1990; 9: 23-27.

Cardona H. Plastic keratoprosthesis. A description of the plastic material and comparative, histologic study of recipient corneas. *Am J Ophthalmol* 1964; 58, 247-252.

Castoro JA, Bettelheim AA and Bettelheim FA. Water concentration gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1998; 29: 963.

Castroviejo R, Cardona H and Devoe AG. The present status of prosthokeratoplasty. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1969; 67: 207-231.

Chang JE, Basu SK and Lee VHL. Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm. Res.* 2000; 17: 670.

Chen WY, Mui MM, Kao WW, Liu CI and Tseng SC. Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: Expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1994; 13: 765-78.

Chen CC, Chang JH, Lee JB, Javier J and Azar DT. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2593-2602.

Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, Zhao S, and Chen R. Study on biocompatibility of complexes of collagen–chitosan–sodium hyaluronate and cornea. *Artificial Organs* 2005; 29: 104.

Chirila TV. Modern artificial corneas; the use of porous polymers. *Trens Polym Sci* 1994; 2: 296-300.

Cintron c, Kublin CL and Covington H. Quantitative studies of corneal epithelial wound healings in rabbits. *Curr Eye Res* 1982; 1: 507.

Coster DJ and Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 2005; 140(6):1112-22.

Crosson CE, Klyce SD and Beuerman RW. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 464.

Davanger M and Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; 229: 560-561.

Davidson PF and Galbavy EJ. Connective tissue remodelling in corneal and scleral wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1478.

De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S y Gómez J. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol Esp* 2004; 28: 714-731.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J and Hedrick MH: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 101–109.

Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y and Ide C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1701–1710.

Dua HS, Gómez JAP and Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 401-408.

Dua HS and Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44: 415-425.

Duran de la Colina JA. Anatomofisiología de la córnea. En: Duran de la Colina *et al.* Complicaciones de las lentes de contacto. Tecnimedia sl. 1998; pp: 13-27.

Ebertz, SL, and McGann, LE. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology* 2004; 49:169.

Engelmann K, Bednarz J and Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res.* 2004; 78: 573–578.

Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG and Lee WR: The eye. Basic sciences in practise. 2nd ed. WB Saunders. 2002.

Freund DE, Mc Cally RL, Farrel RA, Crisol SM, L'Hernault NL and Edelhauser HF. Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1508.

Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 1997; 11: 465-471.

Fujimaki T, Hotta Y, Sakuma H, Fujiki K and Kanai A. Large-scale sequencing of the rabbit corneal endothelial cDNA library. *Cornea*. 1999;18:109-114.

Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C and Guerin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res*. 2000; 19: 497-527.

Geroski DH, and Hadley A. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr. Eye Res*. 1992; 11: 61.

Gipson IK, Spurr-Michaud SJ and Tisdale AJ. Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev Biol* 1988; 126: 253.

Goldberg MF and Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80: 155-171.

Gordon RA and Donzis PB. Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 785-789.

Gosset AR and Dohlman CH. The tensile strength of corneal wounds. *Arch Ophthalmol* 1968; 79: 595.

Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NLC, Hakim M, Song Y, and Watsk, MA. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999; 286: 2169.

Hafezi F, Mrochen M, Fankhauser F and Seiter T. Anterior lamellar keratoplasty with a microkeratome: a method for managing complications after refractive surgery. *J Refract Surg* 2003; 19: 52-57.

Han B, Schwab IR, Madsen TK, and Isseroff RR. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea* 2002; 21: 505.

Hanna C, Bicknell DS and O'Brien J. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961; 65: 695.

Heckmann JG, Lang CJG, Petruch F, Druschky A, Erb C, Brown P and Neundorfer B. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 388-90.

Henderson TR, Coster DJ and Willians KA. The long term outcome of limbal allografts: the search of surviving cells. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 604-9.

Hicok KC, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC and Riggs BL. Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 205–217.

Hogan RN, Heck E and Cavanagh HD. Risk of prion disease transmission from ocular donor tissue transplantation. *Cornea* 1999; 18: 2-11.

Hoft RH, Pflugelder SC, Foster RK, Ullman S, Polack FM, Schiff ER. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. *Cornea* 1997; 16: 132-137.

Houff SA, Burton RC, Wilson RW, Henson TE, London WT, Baer GM, Anderson LJ, Winkler WG, Madden DL, Sever JL. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *N Engl J Med.* 1979; 300: 603-4.

Huang AJW and Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 92-105.

Hornof M, Toropainen E, and Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60: 207.

Hutak CM, Kavanagh ME, and Reddy IK. Comparative development of SIRC rabbit corneal cells grown on polycarbonate- and polyester-based filters. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2002; 15: 133.

Hyman L, Wittpen J and Yang C. Indications and techniques of penetrating keratoplasty. *Cornea* 1992; 11: 573.

Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003; 22: 359-389.

Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P and Sage EH. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialised extracellular matrices. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 721.

Katz M. The human eye as an optical system. In Tasman W, Jaeger EA, editors: *Duane's clinical ophthalmology*, vol 1, Philadelphia, 1989, JB Lippincott Co.

Kawazu K, Shiono H, Tanioka H, Ota A, Ikuse T, Takashina H, and Kawashima Y. Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports. *Curr. Eye Res* 1998; 17: 125.

Kawazu K, Yamada K, Nakamura M, and Ota A. Characterization of cyclosporin A transport in cultured rabbit corneal epithelial cells: p-glycoprotein transport activity and binding to cyclophilin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40: 1738.

Kenion KR and Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96: 7009-7022.

Kim MK, Heo JW, Lee JL, Wee WR and Lee JH. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after in vivo transplantation. *Curr Eye Res.* 2005; 30(8):639-46.

Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J and Thoft RA. Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 577-581.

Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C and Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108: 1569-74.

Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. An Evaluation of Cultivated Corneal Limbal Epithelial Cells, Using Cell-Suspension Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2114-2121.

Krusse FE. Stem cells and the corneal epithelial regeneration. *Eye* 1994; 8: 170-183.

Kurpakus, MA, Stock EL, and Jones JC. Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990; 31: 448.

Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med.* 1998; 338(17):1174-80.

Lamparter J, Dick HB, Krummenauer F. Clinical benefit, complication patterns and cost effectiveness of laser in situ keratomileusis (LASIK) in moderate myopia: results of independent meta analyses on clinical outcome and postoperative complication profiles. *Eur J Med Res.* 2005; 10 (9):402-9.

Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Win KJ and Pearson TC. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts by blockade of the CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381: 434-438.

Latkany R, Tsuk A, Sheu MS, Loh IH and Trinkaus-Randall V. Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelialization. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 29-37.

Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Kotsarelis G and Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and cornea epithelia: implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 1991; 32: 1864.

Lee DY and Cho KH. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res* 2005; 296: 296–302.

Legeais JM, Renard G, Parel JM, Serdarevic O, Mei-Mui M, and Pouliquen Y. Expanded fluorocarbon polymer for keratoprosthesis. Cellular ingrowth and transparency. *Exp. Eye Res*, 1994; 58, 41-45.

Legeais JM, Renard G, Parel JM, Salvoldelli M and Pouliquen Y. Keratoprosthesis with biocolonization microporous fluorocarbon haptic. Preliminary results in a 24 patient study. *Arch. Ophthalmol*, 1995; 113: 757-763.

Lehrer MS, Sun RR and Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cells and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998; 111: 2867-75.

Leibowitz HM, Trinkaus-Randall V, Tsuk A and Franzblau C. Progress in the development of a synthetic cornea. *Prog Retinal Eye Research* 1994; 13: 605-621.

Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, and Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 48: 207.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguin P, and Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77: 350.

Ma DH, Yao JY, Yeh LK, Liang ST, See LC, Chen HT, Lin KY, Liang CC, Lin KK and Chen JK. In vitro antiangiogenic activity in ex vivo expanded human limbal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45 (8): 2586-95.

Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, and Kenion KR. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 443.

Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136: 263.

McGeorge AJ, Vote BJ, Elliot DA, Polkinghorne PJ. Papillary adenocarcinoma of the iris transmitted by corneal transplantation. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:1379-83.

McLaughlin BJ, Caldwell RB, Sasaki Y and Wood TO. Freeze fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res* 1985; 4: 951.

Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, and Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24: 621.

Melles GR, Lander F, Rietveld FJ, Remeijer L, Beekhuis WH, and Winder PS. A new surgical technique for deep, anterior lamellar keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 327-33.

Melles GR, Lander F, Van Dooren BT, Pels E and Beekhuis WH. Preliminary clinical results of porterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 2000; 107: 1850-6.

Minami, Y, Sugihara, H, and Oono, S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34: 2316.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R and Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110: 349–355.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R. The catalog of human cytoqueratins, patterns of expression in normal epithelia, tumors and culture cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.

Muñoz P, Quiroz H y Morarega E. Anatomía quirúrgica comparada en ojos de perro, gato, cerdo y conejo. *Rev Mex Oftalmol*, 1990; 64 (5): 177- 182.

Myung-Jin J, Yuhan K, Hyon JY, Lai H, Hose S, Sinha D and O'brien T. The effect of Nerve Growth Factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 1338-1341.

Nathan S, Das DS, Thambyah A, Fen C, Goh J and Lee EH. Cellbased therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* 2003; 9: 733–744.

Naughton G. Skin: The first tissue engineered products-The Advanced Tissue Sciences story. *Sci. Am.* 1999; 280 (4): 84-85.

Navarro FA, Mizuno S, Huertas JC, Glowacki J, Orgill DP. Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs. *Wound Repair Regen.* 2001; 9(6): 507-12.

Newsome DA, Foidart JM, Hasell JR, Kratzmer JH, Rodríguez MM, Katz SL. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20: 738-750.

Nerem RM and Sambanis A. Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1: 3-13.

Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22, S28.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T and Tano Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosa epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351: 1187-96.

Nishida, K., Yamato M., Hayashida, Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Nagai S, Kikuchi A, Tano Y and Okano T. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004; 77: 379.

Orwin EJ and Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000; 6: 307.

Ousley PJ and Terry MA. Objective screening methods for prior refractive surgery in donor tissue. *Cornea* 2002; 21: 181.

Parenteau N. Skin: The first tissue engineered products-The Organogenesis history. *Sci. Am.* 1999; 280 (4): 83-84.

Patel NP, Kim T, Rapuano CJ, Cohen EJ and Laibson PR. Indications for an outcomes of repeat penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 2000; 107: 719-724.

Pfister RR. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol* 1973; 12: 654.

Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L and Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94: 223–229.

Porter RA, Brown RA, Eastwood M, Ocleston NL and Khaw PT. Ultrastructural changes during contraction of collagen lattices by ocular fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1998; 6: 157.

Rabinowitz, YS, Dong L and Wistow G. Gene expression profile studies of human keratoconus cornea for NEIBank: a novel cornea-expressed gene and the absence of transcripts for aquaporin 5. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46: 1239.

Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986; 27: 474-479.

Reichl S, Bednarz J, and Muller-Goymann, CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br. J. Ophthalmol.* 2004; 88: 5608.

Reichl S, and 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.

Rheinwald JG, Green H (1). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975; 6(3): 331-43.

Rheinwald JG, Green H (2). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell.* 1975; 6(3): 317-30.

Richard NR, Anderson JA, Weiss JL, and Binder PS. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr. Eye Res.* 1991; 10: 739.

Robb RM and Kuwabara T. Corneal wound healing I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Arch Ophthalmol* 1962; 68: 636-642.

Robert PY, Adenis JP, Pleyer U. How "safe" is corneal transplantation? A contribution on the risk of HSV-transmission due to corneal transplantation. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222(11):870-3.

Rozsa A and Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings of rabbit corneal epithelium. *Pain* 1982; 14: 105-120.

Rodríguez A y Touriño R. Clasificación de deficiencias del limbo. En: Benítez del Castillo et al. Superficie ocular. MAC LINE, S.L. 2004; pp: 29-36.

Sawada H, Konomi H and Hirose K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *J Cell Biol.* 1990; 110:219-227.

Schermer A, Galvin S and Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and culture suggest limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103: 49-62.

Schneider AI, Maier-Reif K and 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.

Sher S, Hull B, Rosen S, Church D, Friedman L and Bell E. Acceptance of allogenic fibroblast in skin equivalent transplants. *Transplantation* 1983; 36: 552-557.

Shimakazi J, Yang H-Y and Tsubota K. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997; 104: 2068-76.

Solter D and Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283: 1468-1470.

Strampelli B and Marchi V. Osteo-odonto-keratoprosthesis. *Ann Ophthalmol Clin Ocul* 1970; 96:1-57.

Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, Lubensky TC, and Janmey PA. Nonlinear elasticity in biological gel. *Nature* 2005; 435: 191.

Sumide T, Nishida K, Yamato M, et al. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J.* 2006; 20: 392-394.

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

Tegtmeyer, S, Papantoniou, I and Muller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 51: 119.

Teixeira AI, Nealey PF and Murphy CJ. Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A* 2004; 1; 71 (3): 369-76.

Terry MA and Ousley PJ. Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures. The first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. *Ophthalmology* 2003; 110: 764.

Thoft RA and Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelium maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 1442-1443.

Thomass CC. The rabbit eye in research. Springfield: Charles C. Thomas, 1964.

Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, Suhonen P and Urtti A. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42: 2942.

Trinkaus-Randall V, Capecchi J, Newton A, Vadasz A, Leibowitz H and Franzblau C. Development of a biopolymeric keratoprosthesis material: Evaluation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 1988. 29, 233-400.

Trinkaus-Randall V, Capecchi J, Sammon L, Leibowitz HM and Franzblau C. In vitro evaluation of fibroplasias in a porous polymer. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1990; 31: 1321-1326.

Trinkaus-Randall V, Banwatt R, Capecchi J, Leibowitz HM and Franzblau C. In vivo evaluation of fibroplasias in a porous polymer. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1990; 32: 3245-3251.

Trinkaus-Randall V, Wu XY, Tablance R and Tsuk A. Implantation of a synthetic cornea: Design, development and biological response. *Artif Organs* 1997; 21: 1185-1191.

Tseng SCG. Concept and application of limbal Stem cells. *Eye* 1989; 3: 141-157.

Tsuk A, Trinkaus-Randall V and Leibowitz HM. Ultraviolet light absorbing hydrogel materials for keratoprosthesis. *J Biomed Mater Res*, 1997. 34: 299-304.

Uchiyama K, Ischida C, Yago S, Kurayama H and Kitmoto T. An autopsy case of Creutzfeldt-Jacob disease associated with corneal transplantation. *Dementia* 1994; 8: 466-473.

Van Andel P, Cuperus P, Kolenbrander M, et al. A glass-platinum keratoprosthesis with peripheral episcleral fixation: Results in the rabbit eye. Third world Biomater Cong 1988. Kyoto, Jpn. Abstr. 5E-45.

Waring WO, Laibson PR and Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane, with emphasis on endothelial metaplasia. *Surv Ophthalmol* 1974; 18: 325.

White JH and Gona O. Proplast for keratoprosthesis. *Ophthalmol Surg* 1988; 19: 331-333.

Yaghouti F, Nouri M, Abad JC, Power WJ, Doane MG and Dohlman CH. Keratoprosthesis: preoperative prognostic categories. *Cornea* 2001; 20: 19-23.

Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen BR, and Parenteau, NL. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 621.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.