



**UNIVERSIDAD DE LEON**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGIA ANIMAL**

**TESIS DOCTORAL**

**INGENIERIA DE TEJIDOS EN LA  
RECONSTRUCCION DE LA SUPERFICIE  
OCULAR:**

**UTILIZACION DE MATRICES DE FIBRINA  
COMO NICHOS DE CELULAS MADRE CORNEALES**

**Elena Vuelta López**

**León, 2009**

***Si puedes mirar, ve.***

***Si puedes ver, repara.***

***LIBRO DE LOS CONSEJOS***

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis directores de tesis, por haberme ayudado a llegar al final de esta primera etapa de mi formación como investigadora.*

*A mi jefe, Javier Iglesias, por haberme dado la oportunidad de comenzar a trabajar en este campo y otros muchos campos, y por la confianza que ha depositado en mí.*

*A todos mis compañeros del Establecimiento de Tejidos, con los que he sufrido y disfrutado de tantas horas de trabajo, por estar siempre dispuestos a colaborar y por su continuo ánimo.*

*En especial a Juanjo por cuidar y preocuparse por mí, haciendo siempre que todo fuera más fácil durante las largas horas de laboratorio, al que aprecio enormemente.*

*A todo el personal del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid con el que he tenido el placer de colaborar durante todos estos años, por ayudarme, enseñarme y corregirme.*

*Al equipo del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, por sus consejos y su continua disponibilidad.*

*A Paulino, Silvia y Antonio, del Servicio de Microscopía de la Universidad de León, por tratarme siempre tan bien y resolver todos mis conflictos "microscopicos".*

*A mis padres y hermana, porque son, sin dudarlo, los que más me han "sufrido" estos últimos años, a los que quiero y agradezco todo su cariño, paciencia y comprensión.*

*Al resto de mi familia y amigos, por animarme siempre aún con el poco tiempo que les he prestado durante todo este tiempo.*

*A Marina, por su apoyo constante, sus consejos y acompañarme siempre en los buenos y malos momentos.*

## **FINANCIACION**

Este trabajo de investigación está integrado en el proyecto global desarrollado en las siguientes estructuras de investigación de carácter público (de las que la doctoranda, Elena Vuelta, y los directores, Javier Iglesias y Margarita Calonge, forman parte) de las que ha recibido apoyo económico:

- CIBER-BBN (Centro de Investigación Biomédica en Red – Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina). Grupo de Superficie Ocular del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), de la Universidad de Valladolid. Investigadora principal: Margarita Calonge Cano.
- Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León. Grupo de Superficie Ocular del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), de la Universidad de Valladolid. Investigadora principal: Margarita Calonge Cano.

A su vez, la realización de este trabajo de investigación ha recibido el apoyo económico de las siguientes instituciones privadas:

- Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco.
- Obra Social de Caja España.

La temática desarrollada en esta tesis doctoral ha dado lugar, de forma parcial, a la solicitud del siguiente proyecto de investigación, aún no resuelto:

- Ministerio de Ciencia e Innovación. Ayudas para el Subprograma de Fomento de la Cooperación Científica internacional-Plan E. Convocatoria 2009. Proyecto: Autologous human adipose tissue-mesenchymal stem cells (AT-MSc) can reverse corneal blindness arising from ocular surface failure. Investigador principal: Margarita Calonge Cano.

## **DIVULGACION CIENTIFICA Y APROVECHAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

- Esta tesis doctoral ha originado una solicitud de patente a la Oficina Española de Patentes y Marcas, de reciente aprobación. Por este motivo se ha tenido que evitar la divulgación científica de su contenido. Solicitud de patente nº P200930389, referente a "Gel de fibrina que contiene fibroblastos y células epiteliales del limbo esclero-corneal para bioingeniería de la superficie ocular (córnea, conjuntiva y limbo esclero-corneal" a nombre de la Fundación Clínica San Francisco de León, de la Universidad de León y de la Universidad de Valladolid. Inventores: J. Iglesias; E. Vuelta; M. Calonge. Fecha de solicitud: 30/06/09.
- La práctica totalidad de esta tesis será enviada a la revista Tissue Engineering para su consideración: Vuelta E, Calonge M, Corrales RM, Diebold Y, Martínez-Ososrio H, Gonzalo-Orden M, Iglesias J. Tissue engineering of an ocular stem cell niche: corneoscleral limbal cell-containing fibrin constructs (LCFC).

**INDICE**

---

## INDICE

<b>I.- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.- El aparato de la visión	2
2.- La superficie ocular	4
2.1.- La película lagrimal	5
2.2.- Los párpados	6
2.3.- La conjuntiva	6
2.4.- La córnea	7
2.5.- El limbo esclero-corneal	10
3.- Las células madre del limbo	12
3.1.- Células madre del epitelio limbar (CMEL)	12
3.1.1.- Características de las CMEL	12
3.1.2.- Mecanismo de reparación corneal	16
3.1.3.- Características del nicho de las CMEL	18
3.2.- Células madre mesenquimales del estroma limbar (CMML)	22
4.- Síndrome de insuficiencia límbica (SIL)	23
4.1.- Etiología. Clasificación	23
4.2.- Signos clínicos	25
4.3.- Diagnóstico	25
4.4.- Tratamientos	26
5.- Técnicas de expansión ex vivo de las CMEL	30
6.- Ingeniería tisular y superficie ocular	34
6.1.- La fibrina como biomaterial	36
6.2.- Aplicaciones de la ingeniería tisular en la superficie ocular	40

---

<b>II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
1.- Objetivo general	43
2.- Objetivos específicos	43
<b>III.- MATERIAL Y METODO</b>	<b>45</b>
1.- Material y equipamiento	46
2.- Obtención y procesamiento de muestras biológicas	46
2.1.- Animales	46
2.2.- Recogida de globos oculares	47
2.3.- Obtención de muestras de sangre total	48
2.4.- Procesamiento de las muestras	49
2.4.1.- Obtención de muestras de tejido limbar a partir de los globos oculares	49
2.4.2.- Aislamiento y preservación de plasma	51
2.4.3.- Estudios microbiológicos	51
3.- Técnicas de cultivo celular	52
3.1.- Técnicas de digestión	53
3.1.1.- Protocolo estándar (Pest)	53
3.1.2.- Protocolo invertido (Pinv)	54
3.2.- Cuantificación celular y estimación de la viabilidad	56
3.3.- Establecimiento de cultivos primarios	57
3.3.1.- Cultivo de células epiteliales	57
3.3.2.- Cultivo de células estromales	58
3.4.- Realización de subcultivos	58
3.5.- Ensayos de multipotencialidad de la población estromal aislada del tejido limbar	59

---

---

4- Construcción de sustitutos limbares (GFCL)	60
4.1.- Estudios de polimerización de los geles de fibrina	62
4.2.- Elaboración de los sustitutos estromales o GFF	62
4.3.- Elaboración de los sustitutos limbares o GFCL	63
5.- Caracterización celular	63
5.1.- Estudio de la expresión de antígenos específicos. Técnicas de inmunofluorescencia	63
5.1.1.- Procesamiento de los tejidos control de limbo porcino	64
5.1.2.- Procesamiento de las células en cultivo	64
5.1.3.- Protocolo de inmunofluorescencia y anticuerpos utilizados	65
5.2.- Estudios de diferenciación de la población estromal	66
5.2.1.- Diferenciación osteogénica	67
5.2.2.- Diferenciación adipogénica	67
5.2.3.- Diferenciación condrogénica	68
6.- Análisis de los sustitutos (GFF y GFCL)	68
6.1.- Estudios histológicos	68
6.1.1.- Protocolos de tinción	70
6.2.- Propiedades estructurales. Microscopia electrónica de barrido (MEB)	72
6.3.- Crecimiento celular	73
6.4.- Propiedades mecánicas	74
7.- Análisis estadístico	74

---

<b>IV.- RESULTADOS</b>	<b>75</b>
1.- Técnicas de digestión	76
2.- Cultivo celular	79
3.- Estudios de inmunofluorescencia	83
3.1.- Tejido limbar, corneal y conjuntival	84
3.2.- Poblaciones celulares	93
4.- Ensayos de multipotencialidad	101
4.1.- Diferenciación osteogénica	101
4.2.- Diferenciación adipogénica	102
4.3.- Diferenciación condrogénica	103
5.- Sustitutivos estromales y limbares: GFF y GFCL	104
5.1.- Definición de la composición de los geles de fibrina	104
5.2.- Estudios de crecimiento celular	105
5.3.- Estudios histológicos: microscopia óptica	106
5.4.- Estudios estructurales: MEB	110
5.5.- Propiedades mecánicas: contracción de los geles.	112
<b>V.- DISCUSION</b>	<b>113</b>
1.- Origen de las muestras biológicas	115
2.- Técnicas de digestión y expansión celular	116
3.- Caracterización celular	120
4.- Ensayos de multipotencialidad	124
5.- Sustitutivos	125
<b>VI.- CONCLUSIONES</b>	<b>130</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>134</b>

---

<b>ANEXO I</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>148</b>

## **FIGURAS**

Figura 1: El aparato de la visión.

Figura 2: Composición histológica del globo ocular.

Figura 3: Sección histológica de la superficie ocular.

Figura 4: El limbo esclero-corneal.

Figura 5: Características morfológicas de las células madre epiteliales del limbo (CMEL).

Figura 6: El nicho de las células madre epiteliales del limbo (CMEL). Mecanismo de migración centripeto.

Figura 7: Estructura de las criptas limbares y las proyecciones focales del estroma.

Figura 8: Aspecto macroscópico de la superficie ocular de pacientes afectados por síndrome de insuficiencia límbica (SIL) total o parcial.

Figura 9: Representación esquemática de la expansión ex vivo de las células madre del epitelio limbar (CMEL) a partir de explantes.

Figura 10: Representación esquemática de la expansión ex vivo de las células madre del epitelio limbar (CMEL) a partir de una suspensión celular.

Figura 11: Estructura del fibrinógeno y mecanismo de polimerización de la fibrina.

Figura 12: Procesamiento de los globos oculares.

Figura 13: Recogida de la muestra de tejido limbar.

Figura 14: Diagrama del protocolo estándar (Pest).

Figura 15: Diagrama del protocolo invertido (Pinv).

Figura 16: Representación esquemática del procedimiento de elaboración de los sustitutivos limbares (GFCL).

Figura 17: Rendimiento celular total.

Figura 18: Rendimiento celular parcial.

Figura 19: Morfología de las células de naturaleza aparentemente estromal.

Figura 20: Proliferación de las poblaciones de células estromales.

Figura 21: Morfología de las células de naturaleza aparentemente epitelial.

Figura 22: Proliferación de las poblaciones de células epiteliales.

---

Figura 23: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en el tejido limbar.

Figura 24: Expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en el tejido limbar.

Figura 25: Expresión de colágeno de tipo II en el tejido limbar.

Figura 26: Expresión de connexina 43 (Cx43) en el tejido limbar.

Figura 27: Expresión de desmoplaquina en el tejido limbar.

Figura 28: Expresión de integrina  $\beta$ 1 en el tejido limbar.

Figura 29: Expresión de pan-citoqueratina en el tejido limbar.

Figura 30: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 31: Expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 32: Expresión de colágeno de tipo II en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 33: Expresión de connexina 43 (Cx43) en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 34: Expresión de desmoplaquina en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 35: Expresión de integrina  $\beta$ 1 en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 36: Expresión de pan-citoqueratina en las células estromales en P0 y P1 y epiteliales en P0.

Figura 37: Resultados de los ensayos de diferenciación osteogénica.

Figura 38: Resultados de los ensayos de diferenciación adipogénica.

Figura 39: Resultados de los ensayos de diferenciación condrogénica.

Figura 40: Crecimiento de las células de naturaleza estromal en el interior de de los sustitutivos estromales (GFF).

Figura 41: Tinción hematoxilina-eosina de los sustitutivos estromales (GFF).

Figura 42: Tinción hematoxilina-eosina de los sustitutivos limbares (GFCL).

Figura 43: Tinción azul alcian de los sustitutivos limbares (GFCL).

Figura 44: Tinción elástica de van Gieson de los sustitutos limbares (GFCL).

Figura 45: Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de los sustitutos estromales (GFF).

Figura 46: Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de los sustitutos limbares (GFCL).

## **TABLAS**

Tabla 1: Clasificación del síndrome de insuficiencia límbica (SIL) en función de la naturaleza de la etiología subyacente.

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de la utilización de biomateriales sintéticos y naturales.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los estudios de inmunofluorescencia.

Tabla 4: Rendimiento de viabilidad celular.

Tabla 5: Porcentaje de cultivos primarios exitosos obtenidos a partir de las suspensiones celulares obtenidas mediante los protocolos estándar (Pest) e invertido (Pinv).

Tabla 6: Resultados de los estudios de inmunofluorescencia.

Tabla 7: Tiempos de coagulación en función de las concentraciones de ácido tranexámico y cloruro cálcico utilizadas para la elaboración de los geles de fibrina.

---

## **ABREVIATURAS**

<b>ALDH1A1:</b>	Aldehído deshidrogenasa 1A1
<b><math>\alpha</math>-SMA:</b>	Alfa-actina de músculo liso
<b>AUCL:</b>	Autoinjerto conjuntivo-limbar
<b>ALQL:</b>	Aloinjerto queratolimbar
<b>ir-ALCL:</b>	Aloinjerto conjuntivo-limbar prodecente de individuos relacionados
<b>CAT:</b>	Célula amplificadora transitoria
<b>CDT:</b>	Célula diferenciada terminal
<b>CMEL:</b>	Célula madre del epitelio limbar
<b>CMML:</b>	Célula madre mesenquimal del estroma limbar
<b>CMM:</b>	Célula madre mesenquimal
<b>CPM:</b>	Células post-mitótica
<b>CK:</b>	Citoqueratina
<b>Cx43:</b>	Connexina 43
<b>DMEM:</b>	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>GFF:</b>	Gel de fibrina que contiene fibroblastos o sustitutivo estromal
<b>GFCL:</b>	Gel de fibrina que contiene células del limbo o sustitutivo limbar
<b>MCE:</b>	Medio de cultivo para células epiteliales
<b>MCIA:</b>	Medio de inducción adipogénica
<b>MCIC:</b>	Medio de inducción condrogénica
<b>MCIO:</b>	Medio de inducción osteogénica
<b>MCF:</b>	Medio de cultivo para células fibroblásticas
<b>P0:</b>	Cultivo primario
<b>P1:</b>	Primer subcultivo o pase

<b>PBS:</b>	Solución tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline)
<b>Pest:</b>	Protocolo de digestion estándar
<b>PFE:</b>	Proyecciones focales del estroma
<b>Pinv:</b>	Protocolo de digestión invertido
<b>TGF-<math>\beta</math>1:</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
<b>T/E:</b>	Tripsina/EDTA
<b>TEx:</b>	Tasa de expansión



## **I.- INTRODUCCION**

## **I.- INTRODUCCION**

Los órganos de los sentidos aportan a los seres vivos la capacidad de apreciar elementos del ambiente externo, desencadenando sensaciones y respuestas ante los estímulos que vía sensorial son recibidos por el organismo. Así, hacen posible la recepción de los sonidos, la apreciación de sabores y olores, el reconocimiento de texturas y temperaturas, y la apreciación de imágenes.

De los cinco sentidos, la visión es probablemente el más importante, en tanto que cualquier alteración de la capacidad visual deriva en una considerable disminución de la calidad de vida de los individuos.

### **1.- EL APARATO DE LA VISION**

En la mayoría de las especies de vertebrados los ojos se encuentran situados a ambos lados de la cabeza, dentro de una cavidad ósea protectora, la órbita. En su interior, el globo ocular y el nervio óptico están acompañados por la musculatura extraocular, los vasos sanguíneos, las fibras nerviosas y el tejido adiposo orbitario. Todos estos componentes junto con los anexos del globo ocular (conjuntiva, párpados, cejas, pestañas y aparato lagrimal) constituyen el aparato de la visión (Figura 1A). Éste se encarga de recoger la información de las imágenes que llegan del ambiente circundante (intensidad de luz, color, forma, tamaño, movimientos) para enviarla, a través del nervio óptico, hacia el sistema nervioso central.

La situación anatómica del globo ocular y el amplio rango de movimientos que presenta, permiten la apreciación prácticamente panorámica del ambiente circundante. Dicha capacidad de movilidad se debe a la existencia de un sistema motor constituido por tres grupos de músculos (Figura 1B). Los músculos rectos interno y externo, responsables de los movimientos del ojo en el plano horizontal, los músculos rectos superior e inferior que permiten la movilidad ocular en un plano principalmente vertical, y los músculos oblicuos superior e inferior que facilitan básicamente la realización de movimientos de torsión. Además el movimiento de ambos ojos presenta una coordinación notablemente simétrica.

Histológicamente, el globo ocular está constituido por tres capas concéntricas de tejido conectivo: la capa externa o túnica fibrosa, la capa media o vascular y la capa interna o retina (Figura 2).

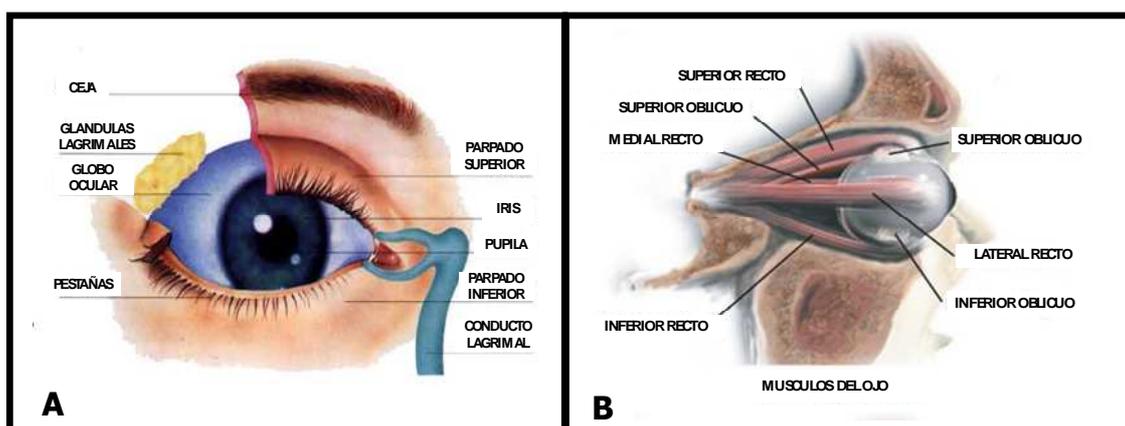


Figura 1:El aparato de la visión. (A) Principales componentes del aparato de la visión: el globo ocular y los anexos o estructuras accesorias (cejas, glándulas lagrimales, párpados, pestañas). (B) Diagrama del aparato motor del globo ocular, constituido por los músculos rectos y oblicuos.

La capa externa es una cápsula fibroelástica, firme y protectora, que rodea por completo a las demás estructuras del ojo. Desempeña una función de sostén, ya que junto con la presión intraocular, es responsable del mantenimiento de la forma y turgencia del globo ocular. La parte anterior de esta capa, la córnea, es transparente, mientras que los cinco sextos posteriores restantes de esta cubierta fibrosa, la esclera, son opacos y de aspecto blanquecino. Ambas zonas, están unidas por una región de transición, el limbo esclero-corneal.

Bajo la esclera se encuentra la úvea, conocida también como capa media, capa vascular o tracto uveal. Esta capa muestra una intensa pigmentación y se encuentra altamente vascularizada, siendo la encargada de la nutrición de la retina externa, el control de los mecanismos de acomodación, la producción de humor acuoso y la regulación de la entrada de luz en el ojo.

La úvea está constituida por tres divisiones anatómicas que vistas desde la parte posterior a la anterior son: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides, localizada entre la esclera y la retina, es la parte más rica en vasos sanguíneos y contiene células

pigmentarias con melanina. Esto le permite no sólo el aporte de nutrientes a la porción retiniana interna, sino también absorber parte de la luz que pasa hacia ella. Hacia la región anterior del globo ocular, extendiéndose por el borde anterior ondulado de la retina, se encuentra el cuerpo ciliar. Éste se trata de un engrosamiento de la coroides que rodea el ecuador coronal del cristalino, al que se encuentra unido a través del denominado ligamento suspensorio, y que actúa modulando el enfoque de los rayos de luz sobre la retina. El cristalino, el ligamento suspensorio y el cuerpo ciliar dividen al ojo en dos compartimentos, uno anterior y otro posterior. El iris es una continuación del cuerpo ciliar que cubre parte del cristalino a modo de diafragma, regulando la cantidad de luz que llega a la retina. Su apertura central es la pupila. Además, esta estructura se encarga de dividir el compartimento anterior del ojo en dos cámaras, una anterior y otra posterior. Dichas cámaras contienen el humor acuoso producido por el cuerpo ciliar y que proporciona los nutrientes al cristalino y a la córnea, además de actuar como un medio óptico no refractante en relación a la córnea. En el gran compartimento posterior del ojo se encuentra el humor vítreo que por una parte mantiene separados el cristalino y la retina y, además, representa un medio óptico no refractante en relación al cristalino.

La capa más interna de la anatomía ocular es la retina. Esta es la región que comunica con el cerebro a través del nervio óptico. Se trata de un revestimiento fotosensible de la parte posterior del globo ocular, en el que se encuentran alojados los fotorreceptores y las complejas redes nerviosas que codifican la información visual, formando lo que se conoce como región sensitiva.

## **2.- LA SUPERFICIE OCULAR**

Todas las estructuras del globo ocular y tejidos accesorios que se encuentran en contacto directo con el exterior, constituyen lo que se define como superficie ocular.

Desde el punto de vista anatómico, está compuesta por la córnea, la conjuntiva, la película lagrimal y los párpados. Todos estos elementos son altamente interdependientes y responsables, en primera línea, de la capacidad visual y la protección del globo ocular frente a posibles agentes externos. Además regulan la homeostasis y el estado de hidratación de la superficie ocular, permitiendo el mantenimiento de la transparencia corneal.

Desde el punto de vista histológico, está compuesta por tejido epitelial estratificado no queratinizado, la película lagrimal suprayacente y el tejido estromal subyacente.

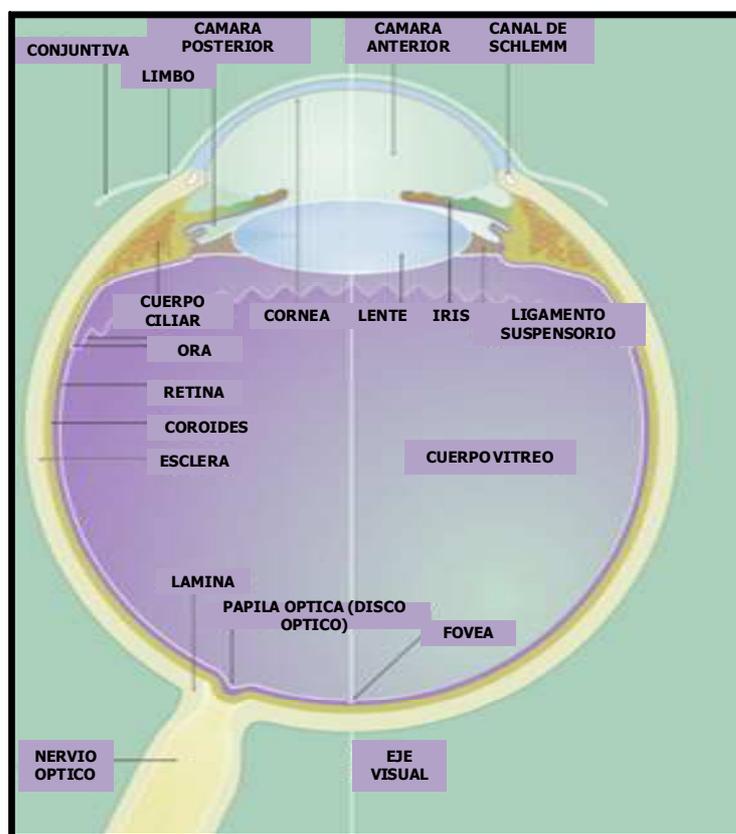


Figura 2: Composición histológica del globo ocular. Dibujo esquemático que detalla los diferentes componentes que constituyen las capas externa, media e interna del globo ocular. Tomado de Young, B., Heath, J.W., 2000. Weather's. Histología funcional, 4ª edición.

## 2.1.- LA PELICULA LAGRIMAL

La película o film lagrimal recubre todos los tejidos que constituyen la superficie ocular. Se compone de tres finas capas, que desde dentro hacia fuera son: la capa mucínica, que recubre la superficie ocular y permite la estabilidad de la película lagrimal, la capa acuosa compuesta básicamente por agua en la que se encuentran disueltas sales y proteínas, y la capa lipídica cuya principal función es la de evitar la evaporación de la lágrima. Constituye un elemento esencial para el mantenimiento de la organización y función corneal pues, entre otras funciones, es responsable del mantenimiento metabólico de su mitad externa.

## **2.2.- LOS PÁRPADOS**

Localizados cubriendo la apertura anterior de la órbita, los párpados están compuestos por una capa de piel, por debajo de la cual se encuentran el músculo orbicular, el tarso (esqueleto del ojo) y la conjuntiva tarsal o palpebral. En el borde anterior de cada párpado se localizan las pestañas.

Funcionalmente, representan una barrera física de defensa frente a posibles traumatismos de la superficie ocular. Además, las grandes glándulas de Meibomio que contienen en el espesor del tarso y que se abren en el borde libre, tras las pestañas, producen la capa lipídica de la película lagrimal. Finalmente, están encargados de la distribución de la película lagrimal, mediante el movimiento de parpadeo, manteniendo el estado de humectación del ojo.

## **2.3.- LA CONJUNTIVA**

La conjuntiva es una membrana mucosa y transparente que tapiza el segmento anterior del globo ocular, desde el límite externo de la córnea hasta los fondos de saco conjuntivales, incluyendo además la superficie interior del párpado. Anatómicamente, se pueden distinguir tres regiones claramente definidas. La conjuntiva bulbar, que recubre la esclera anterior, la conjuntiva palpebral o tarsal, tapizando la parte posterior de los párpados superior e inferior y la conjuntiva de los fondos de saco o fórnix, que define, a modo de repliegue, la continuación entre las dos regiones anteriores, en la zona del canto interno de los párpados, facilitando, a su vez, el movimiento ocular.

A nivel histológico, está constituida por una capa de epitelio asentado sobre una membrana basal que lo separa del estroma o sustancia propia subyacente (Figura 3). El epitelio, cilíndrico, estratificado y no queratinizado, presenta un grosor variable en función de la región de la conjuntiva que se trate. De este modo, suele presentar de 6 a 9 capas celulares en la zona tarsal y de los fórnices, mientras que en la región bulbar el número desciende a entre 3 y 6 capas. Dispersas en dicha porción epitelial, de manera aislada o formando acinis, se encuentran las células caliciformes encargadas de la secreción de mucina que forma en parte la capa interna de la lágrima. La sustancia propia o estroma conjuntival está constituida por tejido fibrovascular en el

que se encuentran células fibroblásticas, células del sistema inmune, los vasos sanguíneos e inervación.

Entre sus funciones, cabe destacar la producción de los distintos componentes de la lágrima (principalmente de los componentes acuoso y mucoso) y la de participar en el sistema de defensa del ojo, principalmente frente a la infección.

## **2.4.- LA CORNEA**

Representa el sexto anterior de la denominada túnica fibrosa del ojo. Es un tejido transparente y, por lo tanto, altamente especializado que permite la refracción (es responsable de un 70% del total de la capacidad de refracción del ojo), la transmisión de luz y un enfoque aproximado de la imagen sobre la retina. Forma parte, junto con los medios transparentes que se encuentran en el interior del globo ocular, del sistema óptico responsable de producir sobre la capa fotosensitiva de la retina una imagen invertida y de pequeño tamaño de los objetos del exterior.

Se trata, además, de uno de los pocos tejidos del organismo que no posee irrigación sanguínea, lo que contribuye a que sea un tejido inmunológicamente privilegiado. Representa, por tanto, una de las regiones anatómicas más especializadas del organismo de los mamíferos, conteniendo además el número más elevado de terminaciones nerviosas sensitivas de todo el organismo.

A nivel estructural, consiste en una lente convexo-cóncava cuya cara anterior está en contacto con la película lagrimal y su cara posterior se encuentra bañada por el humor acuoso. Esto es muy importante, puesto que la región central de la córnea depende estrictamente para su nutrición de ambos fluidos, y por tanto, estos son responsables del mantenimiento de sus requerimientos fisiológicos.

Desde un punto de vista óptico, consiste en una estructura ligeramente elíptica, ya que el diámetro vertical es ligeramente menor que el horizontal, que en la periferia puede llegar a alcanzar un espesor de entre 0,7-0,8 mm, mientras que en la región central presenta un grosor de unos 0,5 mm.

A nivel histológico, en un corte transversal, en la estructura corneal se pueden distinguir 5 regiones bien diferenciadas: un epitelio anterior, la lámina limitante

anterior (capa de Bowman), el estroma corneal, la lámina limitante posterior (membrana de Descemet) y un epitelio corneal posterior o endotelio (Figura 3).

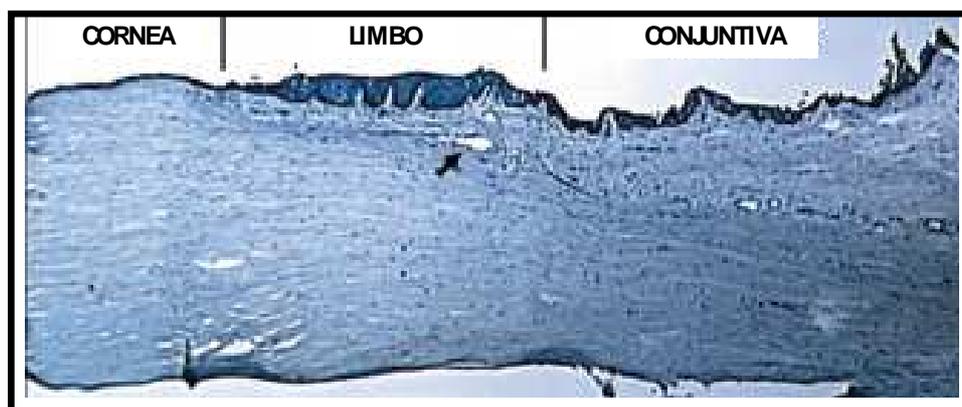


Figura 3: Sección histológica de la superficie ocular. La córnea, conformada por 5 capas, que desde el exterior al interior son el epitelio corneal, la capa de Bowman, el estroma corneal, la membrana de Descemet y el endotelio corneal. La conjuntiva constituida a nivel histológico por una capa epitelial externa que descansa sobre un estroma desorganizado, y que a su vez reposa sobre el tejido escleral. Entre ambas estructuras, se encuentra la región limbar, representando la zona de transición y con unas características histológicas intermedias a los dos tejidos adyacentes. Tomado de: Li, W., Hayashida, Y., Tseng, SCG., 2007. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res. 17, 26-36.

El epitelio corneal es escamoso, estratificado, plano y no queratinizado, y se continua con el epitelio conjuntival en la periferia a través del limbo. Con un grosor medio de 50  $\mu\text{m}$ , está constituido por entre 5 y 6 capas celulares en su zona central, y de 8 a 10 capas en la periferia. Tiene numerosas terminaciones nerviosas libres, lo que explica su gran sensibilidad. Además es capaz de mantener su actividad metabólica y de barrera frente a agentes externos, presentando una fuerte resistencia a la abrasión y rápida capacidad de renovación y/o reparación.

Dentro de esta región epitelial anterior de la córnea se pueden distinguir 3 tipos celulares bien definidos, entre los que se forman uniones intercelulares que confieren a esta estructura una gran estabilidad. En la superficie del epitelio se encuentran las células escamosas, planas o apicales. En la cara más externa de estas células superficiales aparecen microvellosidades y uniones estrechas entre los bordes laterales de las células, que ofrecen una barrera anatómica frente a sustancias externas. A continuación y en dirección a la parte posterior de la anatomía corneal se encuentra la

capa de células intermedias o aladas, que tiene una profundidad de unas tres células. Entre estas células aladas existen numerosas interdigitaciones y uniones de tipo desmosoma. Por último, las células basales conforman una capa de células de aspecto columnar que descansan directamente sobre una lámina basal. Estas constituyen una población de células mitóticamente activas (aunque terminalmente diferenciadas) que son responsables de la reposición del resto de capas celulares más superficiales del epitelio corneal. Entre estas células existen numerosas uniones intercelulares de tipo desmosoma, uniones estrechas y de tipo "gap", además de hemidesmosomas a través de los que se adhieren a la lámina basal constituida por delgadas fibras colágenas, y que participa en la unión de la capa epitelial a la capa de Bowman y al estroma corneal subyacente.

Las células del epitelio corneal expresan un patrón de filamentos intermedios (citoqueratinas, CK) específico, conteniendo el par CK3/CK12, lo que las diferencia de las células de los epitelios conjuntival y limbar, que también constituyen la superficie ocular<sup>1-3</sup>.

El epitelio corneal descansa sobre una lámina acelular y avascular de entre 8 y 12  $\mu\text{m}$  de grosor que se sitúa por debajo de la membrana basal epitelial, y que recibe el nombre de capa de Bowman o lámina limitante anterior. Se trata de la parte más externa del estroma corneal, del cual no puede separarse. Está compuesta por delgadas microfibrillas de colágeno dispuestas al azar, que a microscopía óptica le confieren un aspecto homogéneo, que la distingue del resto de la sustancia propia de la córnea. Está presente en la córnea humana, aunque en otras especies de mamíferos, como el cerdo, no aparece. Ofrece una barrera frente a la invasión corneal por parte de microorganismos y células tumorales.

El estroma corneal o sustancia propia representa un 90% de todo el espesor de la córnea. Está constituido por un tejido conjuntivo denso, compuesto en su gran mayoría por fibras colágenas de un tamaño pequeño y uniforme, separadas entre sí por una distancia uniforme y dispuestas de una manera muy ordenada en capas que presentan una misma ordenación dentro de cada lámina. Entre las diferentes láminas existe una orientación oblicua, siendo esta disposición especial en gran parte responsable de la transparencia corneal. Además, el espacio interfibrilar presenta un cierto contenido de proteoglicanos, queratán sulfato y condroitin sulfato.

Entre las fibrillas de colágeno se encuentran dispersas las células propias del estroma corneal, los fibrocitos corneales o queratocitos. De morfología estrecha, aplanada y con prolongaciones citoplasmáticas extensas, ésta población celular es la encargada del mantenimiento de la estructura del estroma, mediante la síntesis de colágeno y proteoglicanos, así como la expresión de actividades enzimáticas específicas<sup>4</sup>. A su vez, son responsables, al transformarse en fibroblastos o miofibroblastos, de la reparación de las lesiones corneales a nivel estromal<sup>5-7</sup>. Acompañando a éste tipo celular, en el estroma circundante, además pueden aparecer un cierto número de leucocitos, células plasmáticas y macrófagos.

Por debajo del estroma, se localiza una membrana homogénea de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de espesor, la lámina limitante posterior o membrana de Descemet. Sintetizada por las células del endotelio, está constituida por colágeno de tipo IV y fibronectina, lo que le confiere una gran elasticidad y resistencia. A diferencia de la capa de Bowman, se desprende del estroma con facilidad y, tras una lesión, tiene capacidad de regenerarse rápidamente.

La capa más interna de la córnea, el endotelio corneal o epitelio posterior, consiste en una monocapa de células aplanadas, grandes, de morfología cuboidea que conforman un entramado celular de aspecto hexagonal. Entre las células endoteliales existen numerosas interdigitaciones y algunos desmosomas y uniones celulares estrechas, por lo que no se aprecian espacios intercelulares. Contienen una gran cantidad de mitocondrias y abundante actividad ATPasa, lo que las convierte en responsables del transporte de agua hacia la córnea, y, más importante, de sacar agua desde la córnea hacia la cámara anterior. Esto, junto con la fuerte barrera que representa el endotelio, permite, en gran medida, el mantenimiento de la baja hidratación corneal, esencial para su transparencia. A diferencia del epitelio corneal, el endotelio carece de capacidad de renovación de su población celular.

## **2.5.- EL LIMBO ESCLERO-CORNEAL**

El limbo representa la zona de transición entre la córnea transparente y la esclera y conjuntiva opacas (Figura 4). Comprende una banda tisular de entre 1,5 y 2 mm de ancho y 1 mm de espesor, situada entre ambos componentes de la superficie ocular. Morfológicamente, su superficie externa muestra una depresión, el surco escleral

externo, que es el lugar en el que la curvatura de la esclera se continua con la córnea más convexa. En términos anatómicos se puede hablar de una zona de transición limbo-corneal y una zona de transición limbo-escleral.

Se trata de una región altamente vascularizada. Contiene numerosos vasos sanguíneos que desempeñan un papel importante en los procesos inflamatorios de la córnea, además de representar el principal aporte de nutrientes a la región periférica de la cornea avascular, mediante un mecanismo de difusión.

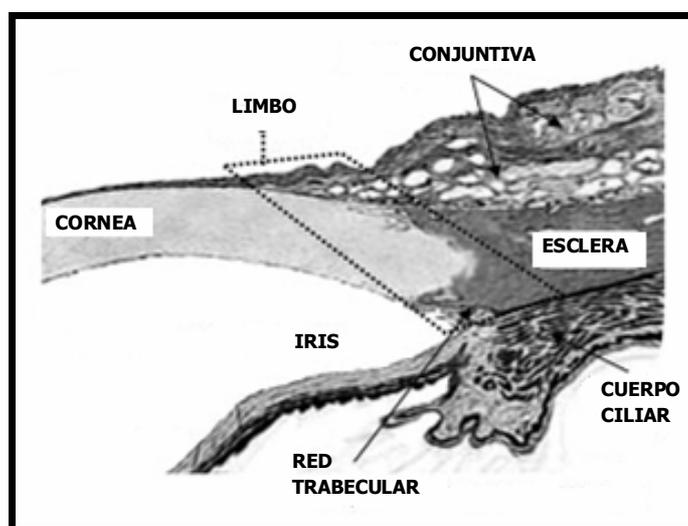


Figura 4: El limbo esclero-corneal. Representa la zona limítrofe entre la córnea y la esclera. Su límite posterior se encuentra definido por el cuerpo ciliar y el sistema de drenaje del humor acuoso. Tomado de: Takács, L., Tóth, A., Vereb, G., 2009. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry* 75A, 54-66.

Debido a su situación fronteriza, la región limbar presenta características histológicas intermedias a los constituyentes que la rodean (Figura 3). Así, a nivel epitelial se constituye por un epitelio pluriestratificado de más de 10 capas celulares, siendo mucho más grueso que los epitelios conjuntival y corneal adyacentes a éste. En esta porción epitelial se han identificado unas zonas de especialización, denominadas empalizadas de Vogt<sup>8;9</sup>. Las células más basales localizadas en dichas empalizadas, se consideran células primordiales, madre o "stem", responsables de los mecanismos de mantenimiento y reparación del epitelio corneal<sup>10;11</sup>.

En esta región, la capa de Bowman desaparece y se sustituye por el estroma conjuntival y el margen anterior de la cápsula de Tenon.

A nivel de la sustancia propia se observa una transición entre el estroma corneal, organizado y transparente, al estroma escleral en el que las fibrillas de colágeno se encuentran formando haces de diferente tamaño y orientación. En la sustancia propia del limbo, al igual que sucede en los estromas corneal y escleral, existe una población de células fibroblásticas, que se encuentran dispersas entre las fibrillas proteicas. Dicha población celular, ha sido definida recientemente como portadora de características de células madre mesenquimales<sup>12;13</sup>, aunque su papel aún no está claramente delineado.

En la cara interna de la región limbar, se encuentra el surco escleral interno. En él, se localizan la malla trabecular y el canal de Schlemm, que constituyen el sistema de drenaje del humor acuoso, desde los procesos ciliares hacia el sistema venoso, en buena parte responsable de la presión intraocular.

### **3.- LAS CELULAS MADRE DEL LIMBO**

#### **3.1.- CELULAS MADRE DEL EPITELIO LIMBAR (CMEL)**

Formando parte de la población de células de la capa basal del epitelio limbar, existe una pequeña población celular, que representa menos de un 10% del total<sup>14</sup>, que se conoce con el nombre de células madre del limbo o células madre del epitelio corneal (CMEL)<sup>10;11;15</sup>. Esta denominación se debe en el primer caso, a su localización, y en el segundo, a que son las responsables del mecanismo de mantenimiento, renovación y reparación del epitelio corneal<sup>16-19</sup>.

##### **3.1.1.- CARACTERISTICAS DE LAS CMEL**

Como sucede en la mayor parte de los tejidos que constituyen el organismo adulto en los que existe una población de células madre, las CMEL, encargadas de la regeneración y reparación del tejido corneal, poseen una serie de características únicas que las definen como células madre:

- Se caracterizan por un estado pobre de diferenciación<sup>11;20</sup>, mostrando un citoplasma primitivo y poco especializado, con un ratio núcleo/citoplasma bajo<sup>15</sup> (Figura 5A).

- Tienen una elevada capacidad de auto-renovación, presentando un elevado potencial de proliferación y una división celular libre de errores<sup>21;22</sup>.
- Presentan una vida media larga, equivalente a la del organismo en el que residen, siendo por tanto capaces de ejercer su función de mantenimiento tisular a lo largo de toda la vida del individuo.
- Su ciclo celular es largo, lo que también puede denominarse como ciclo celular lento, aunque poseen una gran capacidad clonogénica<sup>10;14;23;24</sup>.
- Poseen la capacidad de dividirse de manera asimétrica. Esto implica que, a partir de una célula madre, una de las dos células hijas puede sufrir procesos de diferenciación y especialización, de manera que adquiere características propias del resto de células que constituyen el linaje celular del tejido concreto. La otra célula hija, resultante de dicha división, puede mantener su fenotipo de célula madre, permitiendo así la reposición del reservorio de la población de células troncales del tejido<sup>23;25</sup>.

Durante años, varios grupos de investigación demostraron una serie de evidencias que indican la localización de las CMEL en la región limbar:

- En 1971, Davanger y Evensen demostraron que ocasionalmente podían observarse células pigmentadas que migraban desde el limbo hacia la cornea central<sup>26</sup>. Pero en ningún momento se definió la característica de célula madre.
- Las células de la región basal del epitelio limbar tienen el mayor potencial proliferativo bajo condiciones in vitro, si se comparan con otras células de cualquier parte de la córnea<sup>21;22;27</sup>. Sin embargo, se dividen menos frecuentemente que el resto de células del epitelio corneal. Lo que se ha demostrado mediante inyección de timidina tritiada, siendo únicamente las células basales del limbo capaces de mantener este tipo de marcaje<sup>10</sup>. Esta evidencia, publicada en 1989, suele tomarse como la primera demostración de que las CMEL, responsables de la renovación del epitelio corneal, residían en el limbo.

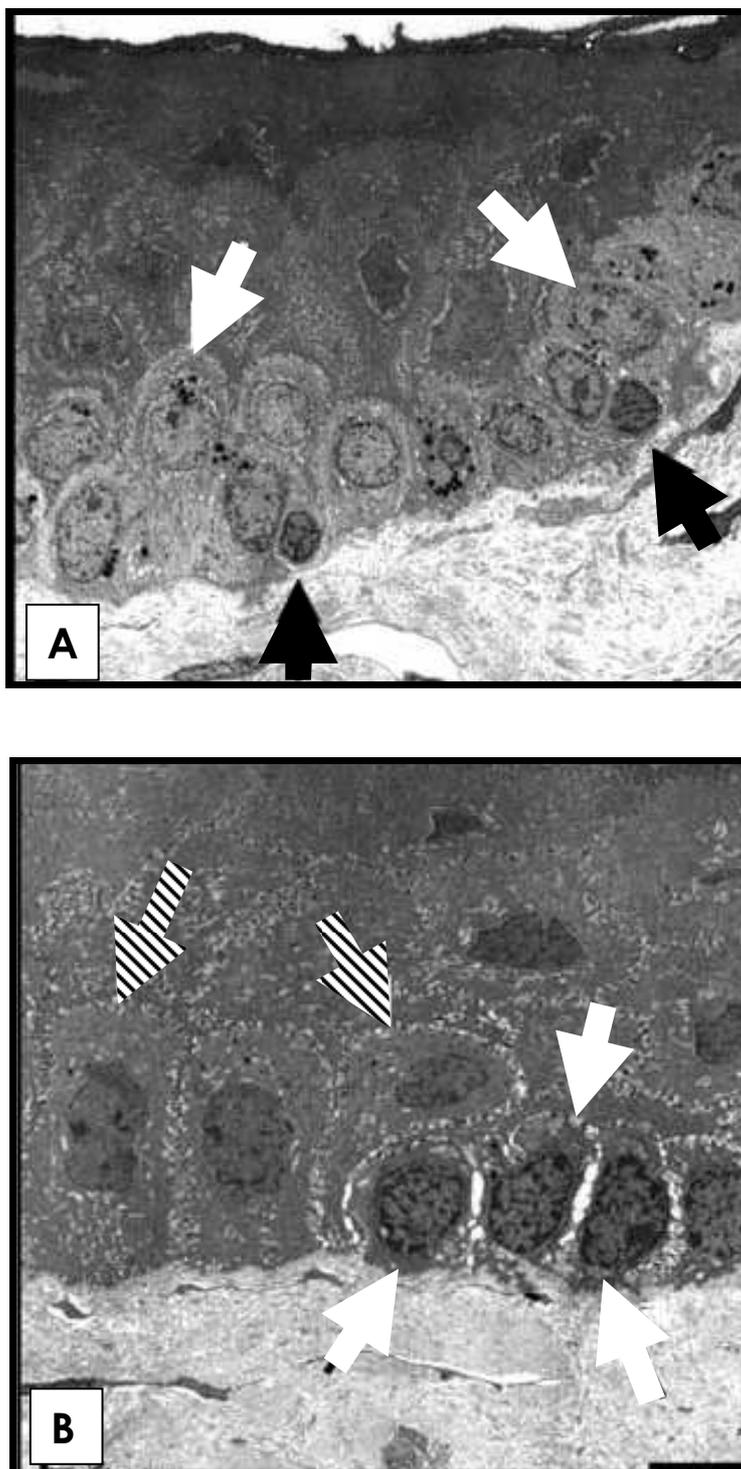


Figura 5: Características morfológicas de las células madre epiteliales del limbo (CMELE). (A) Las flechas negras indican la localización de las CMELE dentro de la región limbar. De pequeño tamaño y pigmentadas, se encuentran rodeadas de la población de células amplificadoras transitorias (CAT) (flechas blancas), con un citoplasma más especializado y de tamaño considerablemente mayor que las CMELE. (B) Ya en el epitelio corneal a nivel basal aparecen CAT (flechas blancas) y células postmitóticas (CPM) (flechas rayadas), aún más especializadas. Tomado de: Schlotzer-Schrehardt, U., Kruse, F.E., 2005. Identification and characterization of limbal stem cells. Exp. Eye. Res. 81, 247-264

- Varios estudios han demostrado que el trasplante de tejido limbar o bien de células del epitelio basal del limbo cultivadas puede resultar en la restauración de un epitelio corneal alterado<sup>17;18;28-30</sup>.
- Las células epiteliales del limbo contienen las células menos diferenciadas del epitelio corneal, carecen de la expresión del marcador de diferenciación típico de las células del epitelio corneal, la citoqueratina 3 (CK3)<sup>11</sup>. Además, también carecen de citoqueratina 12 (CK12).
- Las tasas de mitosis son mayores en el limbo, tanto en condiciones fisiológicas como tras su estimulación. Además, existe una mayor incidencia de tumoraciones y procesos neoplásicos en la región limbar, lo cual parece estar relacionado con la existencia de células relativamente indiferenciadas en esta región.
- El examen mediante citología de impresión de la región limbar, muestra que, morfológicamente, las células del limbo son más pequeñas, están más densamente empaquetadas y tienen un mayor ratio núcleo/citoplasma, si se comparan con las células de los epitelios corneal y conjuntival adyacentes. Además estas células presentan vesículas de melanina, que les confieren protección frente a la radiación de la luz solar<sup>26;31</sup> (Figura 5).
- Cuando el epitelio limbar es eliminado parcial o completamente, se produce una re-epitelización corneal deficiente<sup>32-35</sup>.

Aunque es bien conocida tanto su localización como su implicación en la renovación del epitelio corneal, aún no se ha conseguido definir un marcador molecular que permita identificar la población de las CMEL de manera definitiva y fiable<sup>15;16;36;37</sup>. A este respecto, se han definido una serie de posibles marcadores como las proteínas ABCG2<sup>15</sup>, p63<sup>38</sup> o la alfa-enolasa, entre otros<sup>39;40</sup>, aunque ninguno de ellos parece ser expresado de manera exclusiva por las CMEL.

### 3.1.2.- MECANISMO DE REPARACION CORNEAL

Al igual que muchos otros tipos de tejido epitelial, el corneal, está sometido a continuos procesos de descamación, lo que deriva en la necesidad de la existencia de un mecanismo que asegure un recambio celular continuo<sup>19;23;25</sup>.

La regeneración y reparación del epitelio corneal se produce gracias a un mecanismo de migración centrípeto, que se inicia gracias a las CMEL<sup>10;16;17;25;41-43</sup>. Durante esa migración, las células van sufriendo procesos de multiplicación y diferenciación, que las llevan a constituir los diferentes tipos celulares que componen el epitelio corneal<sup>44;45</sup>.

Si se compara con otros tejidos epiteliales como la piel, el proceso de reparación/renovación de la córnea es algo más complejo, debido a la mayor diferenciación y organización de su estructura. La renovación de las capas celulares más externas de la superficie corneal se produce cada 7 días bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, ante una situación de alteración de dicho epitelio debido a una agresión, la respuesta es inmediata y la población de CMEL se activa llevando a la reparación de la superficie corneal alterada. El proceso de respuesta frente a una agresión puede dividirse en tres fases:

- Fase latente: es el período de entre 4 y 6 horas durante el que se eliminan los restos celulares alterados, las células se redondean y se reduce el número de hemidesmosomas.
- Fase de migración celular: es la fase (24-36 horas) en la que la movilidad celular aumenta, se recupera la pérdida de sustancia, aumentando la densidad celular y la formación de matriz extracelular.
- Fase de proliferación celular: en la que se activa la población de CMEL, se desarrollan los complejos de unión con la membrana basal y se restablecen las terminaciones nerviosas.

El mecanismo de renovación/reparación del epitelio corneal es posible gracias a la capacidad de las CMEL de dividirse de manera asimétrica<sup>23</sup>. Este tipo de división implica que una de las células hijas va a mantener el fenotipo de CMEL, mientras que la otra célula hija que no está destinada al mantenimiento del reservorio de células

madre del tejido, comienza a sufrir procesos de diferenciación y especialización, adquiriendo características funcionales propias del tejido<sup>25;46</sup>. Dicha célula se denomina célula amplificadora transitoria (CAT) (Figura 5A). Se trata de una célula menos primitiva que las CMEL y con una tasa de división más frecuente, aunque presentan una capacidad proliferativa limitada<sup>10;11;20;22;27;40</sup>. Las CAT, además de representar la población de células vecinas que rodean a las CMEL, constituyen la población celular de las regiones basal y suprabasal de la córnea periférica y central. A medida que estas células van alejándose de la región limbar durante el proceso de migración, continúan diferenciándose aún más dando lugar a las células post-mitóticas (CPM) (Figura 5B), que constituyen la población de células aladas del epitelio corneal, y estas a su vez darán lugar a las células terminales diferenciadas (CTD), que constituyen la capa más superficial de células escamosas del epitelio corneal. CPM y CTD, son células altamente especializadas, y sin capacidad de división<sup>23;45;47</sup>.

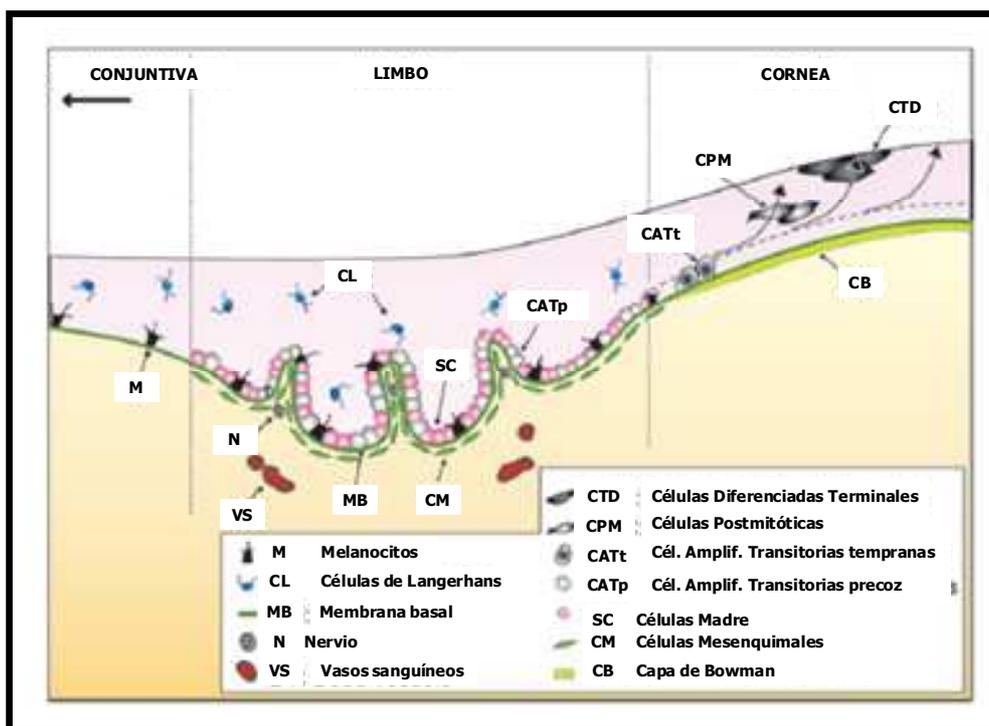


Figura 6: El nicho de las células madre epiteliales del limbo (CMELE) responsables del mecanismo de renovación/repación del epitelio corneal. El nicho de las CMELE está constituido por los diferentes tipos celulares existentes en la región limbar, la membrana basal y el estroma limbar. A partir de las CMELE localizadas en la porción más basal del epitelio limbar, en unas estructuras anatómicas denominadas empalizadas de Vogt, se inicia el mecanismo de migración centrípeta responsable de la renovación/repación corneal. Tomado de: Li, W., Hayashida, Y., Tseng, SCG., 2007. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res. 17, 26-36.

A este mecanismo de regeneración se le conoció como hipótesis X, Y, Z, cuando fue propuesto por Thoft en 1983, debido a que las células descamadas (eje Z) se reemplazan no sólo desde las capas basales del epitelio corneal (eje X) sino que también existe una migración de células desde la región periférica al centro de la córnea (eje Y)<sup>45</sup> (Figura 6), que posteriormente se confirmaron como las CMEL y CAT.

### **3.1.3.- CARACTERISTICAS DEL NICHU DE LAS CMEL**

Normalmente, las células madre se encuentran localizadas en un nicho especializado que les ofrece protección, nutrición y un microambiente específico que aporta los factores extrínsecos necesarios para el mantenimiento del estado y funcionalidad que las definen como células madre adultas<sup>48;49</sup>.

El concepto del nicho de las células madre fue definido por primera vez por Schofield<sup>50</sup>, quien propuso la hipótesis de que las células se encuentran altamente influenciadas por el microambiente en el que están localizadas, definiendo en el caso de las células madre, la adquisición y mantenimiento de sus capacidades específicas<sup>51-53</sup>.

De este modo, la total composición del tejido limbar parece representar el microambiente definido que permite que las células más basales del epitelio limbar puedan desarrollarse como CMEL, y permanecer como tales a lo largo de toda la vida del organismo, siempre y cuando no se den alteraciones que varíen en medida alguna la constitución de dicho microambiente<sup>54</sup>.

En la mayoría de los tejidos u órganos en los que existen procesos de reposición celular que implican la existencia de mecanismos de migración originados en un punto inicial, el nicho donde se alojan las células madre iniciadoras de dicha migración se encuentra localizado en ese punto de comienzo. Esto es lo que ocurre en el nicho de las CMEL<sup>10;16;17;25;41-43</sup>.

Anatómicamente, el nicho de las las CMEL se encuentra localizado en las empalizadas de Vogt (Figura 6)<sup>8;9</sup>. Se trata de una estructura altamente pigmentada debido a la existencia de melanocitos<sup>26</sup>, que, además, se encuentra infiltrada por células de Langerhans<sup>55</sup> y linfocitos T supresores<sup>56</sup>. Esta zona representa el punto de inicio del mecanismo de migración centrípeto responsable de la regeneración y/o reparación de todo el epitelio corneal.

Al tratarse de un tejido de naturaleza epitelial, el nicho de las CMEL se encuentra definido por una serie de componentes que, actuando de una manera colectiva, confieren a estas células madre sus características propias. Entre los constituyentes de éste microambiente se pueden destacar<sup>49;57</sup>:

- Componente celular. Está definido por las CAT, las células de Langerhans, los melanocitos y las células linfocitarias, principalmente, que de manera directa (mediante el establecimiento de uniones intercelulares), o indirecta (a través de la producción y liberación de citoquinas), establecen procesos de comunicación con la población de las CMEL<sup>26;55;56</sup>.
- La matriz extracelular. Los mecanismos de adhesión establecidos entre las CMEL y las proteínas que constituyen la matriz juegan un papel importante en el control de la activación de los mecanismos que definen la entrada de las células en una vía de diferenciación concreta dentro de un linaje celular específico.
- El estroma o sustancia propia subyacente. En él se encuentra alojada una población heterogénea de células, pobremente definida, entre las que se pueden encontrar células de naturaleza fibroblástica y derivadas de la médula ósea<sup>58;59</sup>. Se ha demostrado que el estroma limbar tiene un papel clave, no sólo en la formación del nicho de las CMEL, sino en el mantenimiento de su fenotipo característico<sup>60</sup>.
- Vascularización. Los vasos sanguíneos existentes en el estroma limbar, representan no sólo una vía de aporte de nutrientes al epitelio limbar, sino también de citoquinas y/o factores de crecimiento procedentes de la sangre, que actúan sobre la población celular epitelial de manera paracrina<sup>8;9;15;61</sup>. Los gradientes de concentración de este tipo de moléculas parecen ejercer funciones reguladoras sobre las células tanto del epitelio como del estroma limbar.

- 
- La lámina basal. Su composición parece promover la adhesión de las células epiteliales. Presenta abundantes fibrillas de colágeno de tipo IV y otras fibrillas de anclaje, además de una estructura a modo de digitaciones ondulantes, con papilas de estroma que se extienden hacia el epitelio, lo que conlleva a la unión no uniforme entre el epitelio y el estroma subyacente, y que a su vez permite una protección de las células frente a posibles fuerzas de tensión<sup>62-64</sup>. Además, parece participar en los procesos de modulación de las concentraciones de factores de crecimiento y citoquinas que son liberadas por los diferentes tipos celulares del nicho limbar, para que puedan ejercer así un papel eficaz y preciso sobre las CMEL<sup>65;66</sup>.
  
  - Las citoquinas y factores de crecimiento. Aún se conoce muy poco sobre su papel en la regulación del nicho. En función de la interacción con las células circundantes, Li y Tseng han establecido una clasificación de las citoquinas que actúan en el limbo en función de tres categorías<sup>67</sup>:
    - o Citoquinas de tipo I: son las producidas por el epitelio y cuyos receptores están localizados principalmente en las células estromales (el factor de crecimiento transformante Beta, TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, la interleucina IL-1 $\beta$ , y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF).
  
    - o Citoquinas de tipo II: éstas y sus receptores se encuentran localizados en células tanto epiteliales como estromales (factor de crecimiento similar a la insulina, IGF1, los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, y el factor de crecimiento fibroblástico básico, bFGF).
  
    - o Citoquinas de tipo III: son las producidas por células del estroma, mientras que sus receptores se encuentran en las células epiteliales (factor de crecimiento de queratinocitos, KGF, y factor de crecimiento de hepatocitos, HGF).

El nicho de las CMEL, a su vez, ejerce un importante papel de protección de esta población celular. Físicamente, su localización en las ondulaciones profundas de las empalizadas de Vogt, las mantiene alejadas de cualquier elemento hostil<sup>68</sup>. Además, es bien conocido que el número de empalizadas es mayor en las regiones del limbo superior e inferior por lo que las propias empalizadas se encuentran protegidas a su vez del ambiente externo por los párpados<sup>69-71</sup>. Por otra parte, la existencia de melanocitos dentro del nicho permite la producción de melanina que protege a las CMEL frente a posibles alteraciones de tipo carcinogénico asociadas a la radiación ultravioleta y a la posible aparición de radicales libres<sup>26</sup>.

Recientemente, se ha descrito la existencia de unas estructuras a nivel de las empalizadas de Vogt como candidatas a ser el elemento anatómico definido como nicho de las CMEL, las criptas del epitelio limbar<sup>72</sup> y las proyecciones focales del estroma (PFE)<sup>70</sup>. Las primeras son invaginaciones de células epiteliales que van desde la córnea periférica hasta el estroma limbar (Figura 7A), mientras que las PFE constituyen unas proyecciones digitiformes, que se extienden desde el estroma hacia el epitelio limbar. Las PFE contienen un vaso sanguíneo central rodeado de pequeñas células basales, densamente empaquetadas (Figura 7B).

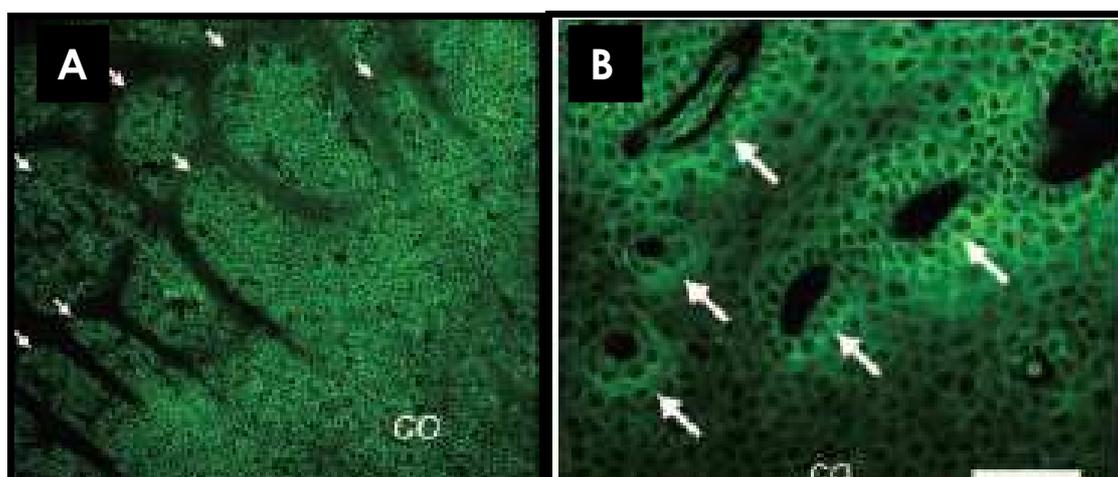


Figura 7. (A) Estructura de las criptas limbares. Las flechas señalan la localización de las células madre del epitelio limbar (CMEL). (B) Estructura de las proyecciones focales del estroma (flechas). Tomado de: Shortt, A.J., Secker, G.A., Munro, P.M., Khaw, P.T., Tuft, S.J., Daniels, J.T., 2007. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells*. 25, 1402-1409

El nicho es extremadamente importante para el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación de la población de las CMEL. Comprende dos lugares, uno quiescente, ocupado por las CMEL propiamente dichas, y otro proliferativo, en el que se encuentran las CAT. Bajo condiciones normales de homeostasis del tejido corneal, el balance de señales existentes en el microambiente de las CMEL favorece el mantenimiento del estado quiescente de las CMEL y, por tanto, los mecanismos de división y diferenciación celular se encuentran inhibidos. A su vez, existe la hipótesis de que el tipo de contacto existente entre las CMEL con la lámina basal participa de manera directa en su capacidad de división de manera simétrica o asimétrica.

### **3.2.- CELULAS MADRE MESENQUIMALES DEL ESTROMA LIMBAR (CMML)**

Recientemente, se ha demostrado la existencia a nivel del estroma corneal<sup>73-75</sup> y limbar<sup>12;13</sup>, de una población de células de aspecto fibroblástico, que de manera similar a otras células madre presenta capacidad de auto-renovación y una elevada plasticidad. Se ha definido que estas células presentan características propias de células madre mesenquimales (CMM).

Las CMM fueron descritas por primera vez en médula ósea por Friedenstein (1976)<sup>76</sup>. Desde entonces, se han publicado diversos orígenes tisulares a partir de los que es posible su aislamiento. Entre estos tejidos se encuentran el tejido adiposo, la médula ósea, la sangre periférica, la dermis y el fluido amniótico, entre otros<sup>77-83</sup>.

En los últimos años, las CMM han representado una de las principales fuentes de células para el desarrollo de tratamientos que implican el trasplante celular<sup>84-87</sup>.

El interés sobre este tipo celular radica en sus características especiales. En primer lugar, las CMM están definidas por su capacidad de adherirse a las superficies de cultivo, lo que además las hace fácilmente cultivables. Por otra parte, presentan multipotencialidad<sup>88-90</sup>. Esta característica, es la responsable de que este tipo celular pueda diferenciarse in vitro o in vivo hacia otros tipos celulares del linaje mesenquimal. De hecho, una característica definitoria de las CMM es que deben ser capaces, bajo las condiciones de inducción adecuadas, de diferenciarse adoptando fenotipos de células óseas, adipocitos y células de cartílago<sup>75</sup>.

Las células madre del estroma limbar (CMML) han demostrado presentar características de CMM, como su comportamiento adherente, la capacidad de auto-renovación, la multipotencialidad y expresión de un fenotipo similar a otras CMM, como las derivadas de médula ósea, en cuanto a la expresión de determinados antígenos de superficie (CD34-, CD45-, CD73-, CD29+, CD105+, CD90+, HLA-DR-)<sup>13</sup>.

Junto a las cualidades propias de células madre, es necesario tener en cuenta que las CMML se encuentran formando parte del nicho de las CMEL, aunque por el momento se desconoce el papel que juegan en el mantenimiento del nicho y/o de la propia población de CMEL.

#### **4.- SÍNDROME DE INSUFICIENCIA LIMBICA**

Debido al importante papel de las CMEL, cualquier tipo de situación patológica que lleve a una pérdida de estas células o a una alteración de su nicho específico, tendrá graves consecuencias sobre la estructura e integridad de la superficie ocular y corneal<sup>11</sup>. La perturbación de la funcionalidad, la destrucción o la inexistencia de las células primordiales del limbo (CMEL) es lo que se conoce como un síndrome de insuficiencia límbica (SIL).

##### **4.1.- ETIOLOGIA. CLASIFICACION**

Las patologías que se engloban bajo el término SIL pueden subdividirse en dos categorías en función de la etiología subyacente<sup>91;92;92-98</sup>:

- SIL derivados de una destrucción de las CMEL por agentes conocidos o reconocibles. Este es el caso de las quemaduras químicas o térmicas, conjuntivitis cicatrizantes autoinmunes (por ejemplo el síndrome de Steven-Johnson o el penfigoide cicatricial) múltiples cirugías o crioterapias, queratopatía inducida por lentes de contacto, infecciones microbianas severas, radiación ionizante y ultravioleta, el uso de medicación como los anti-metabolitos o el 5-fluorouracilo y la mitomicina c (iatrogénicos).
- SIL derivados de la destrucción gradual de la población de células madre del limbo, desconociéndose el factor desencadenante. En estos casos el nicho

estromal de las CMEL suele estar afectado y sufre un deterioro gradual. Dentro de este grupo de patologías se engloban causas congénitas como la aniridia o el coloboma, neoplasias, deficiencias hormonales múltiples, enfermedades ulcerativas periféricas de la córnea, queratopatía neurotrófica, y la insuficiencia limbar idiopática.

En función de la naturaleza de la causa desencadenante del SIL<sup>99</sup>, éste puede ser catalogado como hereditario<sup>96;100</sup> o adquirido<sup>41;101-104</sup> (Tabla 1).

Por otra parte, dependiendo de la extensión de la lesión de la región limbar, puede hablarse de SIL total (difuso) o parcial (localizado)<sup>17</sup>. En el caso del SIL parcial (Figura 8A), tan sólo se ve afectada una región específica del limbo, permaneciendo intacta parte de la población de las CMEL<sup>92;103;104</sup>. En este caso se aprecia una alteración sectorial de la superficie corneal, en aquellos lugares donde el limbo ha sido alterado. En el SIL total, la destrucción o disfunción de las CMEL es total (Figura 8B), a lo largo de los 360° del limbo, viéndose afectado por completo todo el epitelio corneal<sup>92;103;104</sup>.

HEREDITARIA	ADQUIRIDA
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aniridia</li> <li>- Queratitis asociada a una deficiencia endocrina múltiple</li> <li>- Displasia epidérmica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Externa                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quemaduras térmicas o químicas</li> <li>- Queratopatía por lentes de contacto</li> <li>- Infecciones microbianas severas</li> <li>- Cirugías o crioterapias múltiples</li> <li>- Radiación</li> <li>- Anti-metabolitos</li> </ul> </li> <li>- Interna                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conjuntivitis cicatrizantes crónicas (Síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide de las membranas mucosas, epidermolisis tóxica necrotizante)</li> <li>- Queratitis ulcerosa periférica</li> <li>- Queratopatía neurotrófica</li> <li>- Queratopatía bullosa crónica</li> <li>- Limbitis crónica</li> <li>- Pterigium</li> </ul> </li> <li>- Idiopática</li> </ul>

Tabla 1: Clasificación del síndrome de insuficiencia límbica (SIL) en función de la naturaleza de la etiología subyacente. Modificado a partir de: Lavker, R.M., Tseng, SCG., Sun, T-T., 2004. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. Exp. Eye. Res. 78, 433-446.

## **4.2.- SIGNOS CLINICOS**

La característica clínica que define al SIL es la existencia de conjuntivalización o pannus de la superficie corneal<sup>25;92;105-107</sup> (Figura 8). En respuesta a una situación de re-epitelización deficiente de la córnea, su superficie se ve invadida por las células del epitelio conjuntival adyacente, lo cual va acompañado de fenómenos de vascularización asociados a la migración de los vasos sanguíneos existentes en la región limbar.

Acompañando a estos fenómenos de conjuntivalización y vascularización, las córneas afectadas muestran una pobre epitelización (defectos persistentes o erosiones recurrentes), e inflamación estromal crónica (queratitis y cicatrización)<sup>34;92;108;109</sup>.

Debido a estas alteraciones, los pacientes con SIL padecen una irritación severa, fotofobia, lagrimeo, blefarospasmo, capacidad visual disminuida, y episodios recurrentes de dolor asociados a las rupturas persistentes del epitelio corneal.

En algunos casos, la evolución del SIL puede ser subclínica, y los síntomas no aparecen hasta que la enfermedad alcanza un estado declarado, en el que la población de las CMEL se encuentra muy afectada.

## **4.3.- DIAGNOSTICO**

La realización de un diagnóstico fiable del SIL es de vital importancia en la elección del procedimiento adecuado para su tratamiento.

Debido a que los fenómenos de inflamación y vascularización que se producen como consecuencia de un SIL también pueden aparecer como resultado de otros tipos de enfermedades corneales, el signo definitivo de la existencia de un SIL es la presencia de conjuntivalización sobre la superficie corneal<sup>17;25;92</sup>.

De manera convencional, la confirmación de la conjuntivalización se realiza mediante citología de impresión<sup>92</sup>. Esta técnica tiene como objeto detectar la presencia de células caliciformes propias del epitelio conjuntival sobre la superficie corneal. Para ello las muestras son teñidas siguiendo el método del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) (Figura 8B). Aunque también puede realizarse una confirmación del fenotipo propio del epitelio conjuntival, mediante la utilización de anticuerpos frente a las citoqueratinas CK3 y CK19<sup>92;96;110;111</sup>.

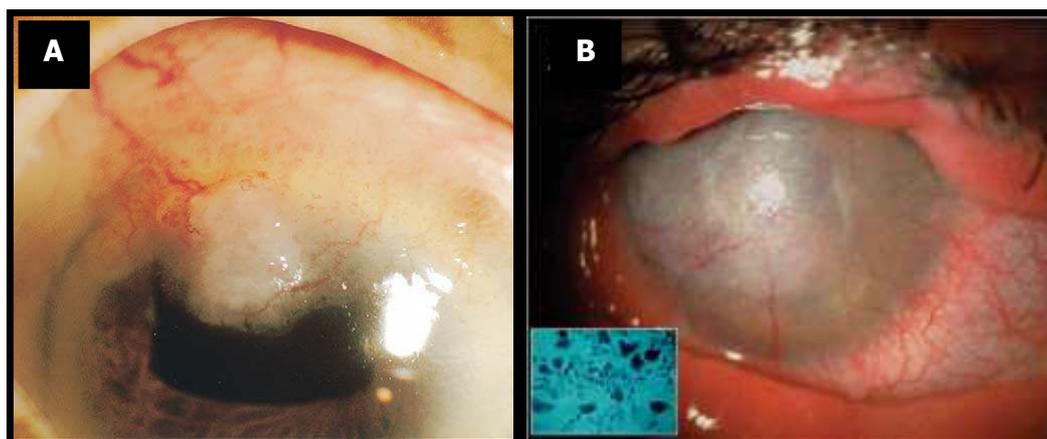


Figura 8: Aspecto macroscópico de la superficie ocular de pacientes afectados por un síndrome de insuficiencia límbica (SIL) parcial y total. (A) SIL parcial originada por tratamiento con mitomicina c, en la que se aprecia el pannus fibrovascular sobre la superficie corneal. Tomado de: Dudney, B.W. and Malecha, M.A., 2004. Limbal stem cell deficiency following topical mitomycin c treatment of conjunctival-corneal intraepithelial neoplasia. *Am. J. Ophthalmology* 137, 950-951. (B) SIL total relacionada con un síndrome de Stevens-Johnson, mostrando una superficie ocular inflamada con extensa vascularización de la córnea y cicatrización corneal. (A y B) La imagen del borde inferior izquierdo muestra las células caliciformes PAS-positivas. Tomado de: Espana, E.M., et al., 2004. Characterization of corneal pannus removed from patients with total limbal stem cell deficiency. *Invest. Ophthalmol.*

Otro método para su detección es la tinción con colorante de fluoresceína. Debido a que el epitelio conjuntival es mucho más permeable que el de la córnea, la superficie corneal que ha sido invadida por el epitelio conjuntival se marca de manera anormal con la fluoresceína.

Por otra parte, el SIL está acompañado por la pérdida de las empalizadas de Vogt<sup>19;96</sup>. Esto puede ser confirmado mediante examen bajo lámpara de hendidura<sup>8;9</sup> y más recientemente, mediante microscopía óptica confocal<sup>112</sup>. Aunque debido a que la arquitectura de las empalizadas no es uniforme a lo largo de toda la circunferencia del limbo, su ausencia no puede ser considerada como indicativo de SIL. El análisis por bio-microscopía puede reflejar, además, la existencia de un epitelio corneal irregular, mate, opaco y de espesor variable.

#### 4.4.- TRATAMIENTOS

En un primer momento, la idea de que la repoblación de la superficie corneal tras una agresión se producía desde el epitelio conjuntival, fenómeno que se conocía como transdiferenciación conjuntival<sup>35</sup>, llevó al tratamiento de manera errónea de las alteraciones de la superficie ocular asociadas a un SIL, mediante el trasplante de tejido conjuntival<sup>101;113;114</sup>.

No fue hasta que Kenyon y Tseng, en 1989, realizaron el primer trasplante de un autoinjerto conjuntivo-limbar (AUCL) en un caso de SIL unilateral, cuando se comprobó la potencialidad del tejido limbar para el tratamiento de este tipo de patologías<sup>115</sup>.

Dos años después, una vez definido el concepto de las CMEL, Kinoshita reafirmó esa potencialidad realizando trasplantes de AUCL procedentes de un ojo contraletal sano en casos de SIL unilaterales, y aloinjertos recogidos de donante cadáver (ALQL) o de individuos vivos relacionados con el receptor (ir-ALCL) en el caso de SIL bilaterales, en un modelo animal en conejo<sup>116</sup>.

Durante los años posteriores, estas técnicas terapéuticas fueron desarrollándose y sufriendo pequeñas modificaciones, representando, a día de hoy, la utilización de los auto o aloinjertos conjuntivo-limbares el tratamiento de elección más frecuente en el caso del SIL.

Hace aproximadamente una década, en el año 1997, fue introducida la idea de utilizar la terapia celular para conseguir la recuperación de la superficie corneal afectada en casos de SIL<sup>117</sup>. Fue entonces cuando se describió por primera vez la utilización de una población de CMEL expandidas ex vivo para su trasplante, como alternativa a los distintos injertos previamente mencionados. Desde entonces, se ha venido ahondando en los esfuerzos de mejorar los resultados de los actuales tratamientos siempre con el objeto de conseguir restablecer la población de células madre ausente o disminuida, mediante este tipo de procedimientos.

En función de la extensión de la superficie limbar afectada por la deficiencia en CMEL, es decir, en base a si se trata de un SIL parcial o total, el tratamiento de elección puede variar sustancialmente.

En el caso de los SIL parciales, una opción es proceder a un tratamiento de tipo conservador, que puede consistir en una lubricación tópica, la aplicación de lentes de contacto protectoras<sup>118</sup> o el uso de colirio de suero autólogo<sup>119</sup>, para prevenir en la medida de lo posible las erosiones del epitelio corneal. Esto se aplica en pacientes en los que la capacidad visual no está comprometida, debido a que el eje visual no se ha visto afectado por la alteración y se encuentra cubierto por epitelio corneal.

Cuando la superficie corneal presenta signos de conjuntivalización, se puede proceder a la realización de una epiteliectomía conjuntival sectorial secuencial<sup>107</sup>. Esta técnica

consiste en el desbridamiento repetido de la lámina de epitelio conjuntival que se encuentra migrando sobre la superficie corneal. El objeto de este desbridamiento es reducir o prevenir la invasión del epitelio conjuntival, intentando facilitar la proliferación de las CMEL que aún permanecen en las regiones de la superficie ocular no afectadas por la alteración.

El trasplante de membrana amniótica también ha dado buenos resultados clínicos en pacientes con SIL de tipo parcial<sup>107;120-122</sup>. Esto es debido a que esta membrana parece representar un sustrato óptimo para promover la migración del epitelio corneal sobre las regiones afectadas.

En todos estos casos, al tratarse de una alteración localizada y parcial de la estructura limbar, la superficie ocular del ojo afectado aún contiene cierta proporción de células madre, a partir de la que se puede producir la reparación del defecto. Esto no ocurre en casos de SIL total, en los que al no existir dicha población celular, las técnicas utilizadas para su tratamiento deben estar basadas en el aporte de CMEL, con el objeto de reponer tanto la ausencia de dicho tipo celular como su función<sup>16;17;19;25;29;41;42;72;103;104;123;124</sup>.

Como alternativas terapéuticas en estos casos de SIL total se puede plantear el trasplante de ALQL<sup>100;123;125;126</sup>, el AUCL y el ir-ALCL<sup>104;127-129</sup>, la queratoplastia penetrante de injertos corneales<sup>130-132</sup> y el implante de CMEL expandidas ex vivo.

El AUCL puede ser utilizado en aquellos pacientes que presentan un SIL bien de tipo parcial o bien total unilateral, ya que implica la recogida del injerto del ojo contralateral sano o, si se trata de un SIL parcial, el tejido puede ser tomado de alguna región no afectada<sup>17;18</sup>. La utilización de autoinjertos representa una ventaja debido a que estos no van a ser rechazados tras su implante. Sin embargo, aunque por lo general la toma del tejido no suele presentar complicaciones, el uso de tejido autólogo lleva asociado el riesgo de que en el ojo sano del que procede el injerto se desarrolle un SIL<sup>32;133</sup>. Aún en casos de SIL unilateral, también pueden aparecer complicaciones en la recogida del injerto en ojos aparentemente sanos, en los que existe un SIL subclínico.

En casos de SIL total bilateral, las opciones existentes para el trasplante de una población de CMEL se restringen a la utilización de aloinjertos, bien procedentes de donante cadáver (ALQL) o bien recogidos de un individuo vivo relacionado con el receptor (ir-ALCL)<sup>104;134;135</sup>. El inconveniente principal de la utilización de este tipo de

injertos es el riesgo de rechazo tras ser trasplantados, aun proviniendo de un donante vivo compatible. Por tanto, el trasplante de ALQL o ir-ALCL implica la necesidad de suministrar una terapia de inmunosupresión sistémica al receptor. Por otra parte, la recogida de tejido limbar en el caso del ir-ALCL lleva asociados los mismos riesgos del AUCL en cuanto al posible desarrollo de un SIL asociado a la escisión del injerto de un ojo sano.

Otra alternativa para el trasplante de las CMEL consiste en el implante de injertos corneo-limbares trepanados de manera excéntrica, mediante queratoplastia penetrante<sup>130-132</sup>.

Todas estas técnicas pueden realizarse de manera individual o mediante el implante combinado de membrana amniótica, lo cual parece mejorar la evolución clínica de los pacientes<sup>136-139</sup>. A su vez, en casos de SIL totales, puede precisarse, un tiempo después de la intervención, la realización de un trasplante corneal.

Aunque todos estos procedimientos han demostrado el éxito a largo plazo en cuanto a la recuperación de la superficie corneal, en los últimos años han adquirido gran importancia los procedimientos terapéuticos basados en el trasplante de CMEL expandidas ex vivo<sup>30;117;137</sup>.

Este tipo de procedimiento presenta una serie de ventajas frente al resto de técnicas convencionales descritas anteriormente. En primer lugar, el tamaño de la biopsia limbar necesario para el correcto establecimiento de un cultivo in vitro es de un tamaño mucho menor que el de los auto o aloinjertos conjuntivo-limbares (normalmente alrededor de 2 mm<sup>2</sup>). Esto disminuye el riesgo potencial de aparición de una disfunción de las CMEL en el ojo donante en el caso de que la biopsia sea de origen autólogo o proceda de un individuo vivo compatible. Por otra parte, esto también hace posible la recogida de nuevas biopsias en el caso en que estas fueran necesarias<sup>28;29;117;137</sup>.

Otra gran ventaja asociada al trasplante de CMEL expandidas ex vivo es que, aún siendo de origen alogénico, la posibilidad de rechazo se ve en gran medida disminuida debido a que en el cultivo son eliminadas las células de Langerhans presentadoras de antígeno, que son las principales responsables de desencadenar la respuesta inmune en el ojo receptor.

En los casos de SIL total en los que parece imposible utilizar una terapia de naturaleza autóloga, se ha planteado como fuente alternativa de células epiteliales la utilización de epitelio de mucosa oral, con el objeto de su expansión para un posterior trasplante<sup>140-143</sup>. Este origen celular presenta ventajas en cuanto a que al tratarse de células autólogas se evita el riesgo de rechazo y además este tipo celular epitelial parece compartir ciertas características con el epitelio corneal (como la expresión de CK3)<sup>144;145</sup>. Sin embargo, aunque podría tratarse de una alternativa prometedora, se trata de una técnica aún en estudio y que no garantiza el aporte de células madre.

## **5.- TECNICAS DE ESPANSION EX VIVO DE LAS CMEL**

Aunque existe una experiencia previa definida en cuanto a la aplicación clínica de las CMEL expandidas ex vivo, los procedimientos a seguir para su aislamiento y cultivo in vitro aún son muy variados y permanecen sin definir. Desde que en 1997, Pellegrini y colaboradores definieran por primera vez la utilidad clínica de las CMEL cultivadas en el tratamiento del SIL, se han publicado diversos protocolos para conseguir una correcta expansión de dicha población celular<sup>30;146</sup>. El objetivo principal de todos esos procedimientos es conseguir establecer la metodología adecuada a seguir para favorecer el crecimiento de las células del epitelio limbar que presentan características de células madre.

Hasta la fecha, existen dos métodos principales para establecer un cultivo de CMEL: el cultivo de explantes<sup>36;137</sup> y el cultivo de suspensiones de células<sup>117;147-149</sup>. De ambos protocolos, el primero ha sido el más utilizado hasta el momento.

En ambos casos, la expansión de las CMEL comienza con la obtención de una pequeña biopsia (alógena o autóloga) de tejido limbar sano, de un tamaño de unos 2 mm<sup>2</sup>, a partir de la cual se puede establecer:

- Cultivo por explante: pequeños fragmentos de tejido que se adhieren a una superficie de cultivo (Figura 9).
- Cultivo a partir de una suspensión celular: implica el procesamiento de la muestra tisular, mediante tratamientos enzimáticos, con el fin de conseguir el aislamiento y la individualización de las células que constituyen dicho

tejido, obteniéndose así una suspensión de células aisladas a partir de la que se puede comenzar el cultivo in vitro (Figura 10).

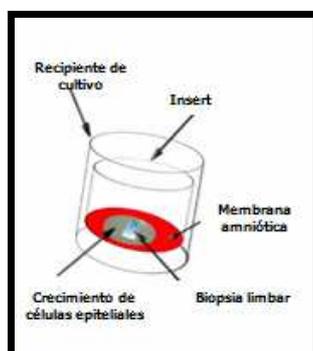


Figura 9: Representación esquemática de la expansión ex vivo de las células madre del epitelio limbar (CME) a partir de explantes. La biopsia limbar debe ser colocada directamente sobre un sustrato de cultivo, como la membrana amniótica. Modificado a partir de: Shortt, A.J., Secker, G.A., Notara, M.D., Limb, G.A., Khaw, P.T., Tuft, S.J., Daniels, J.T., 2007. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv. Ophthalmol.* 52, 483-502.

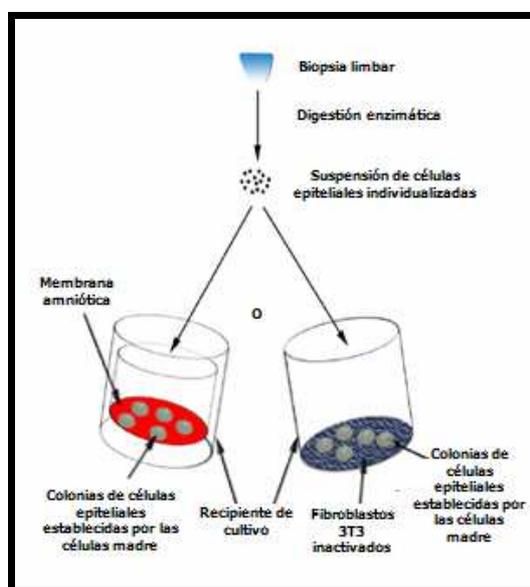


Figura 10: Representación esquemática de la expansión ex vivo de las células madre del epitelio limbar (CME) a partir de una suspensión celular. La biopsia limbar debe ser digerida para obtener una suspensión de células individualizadas que puede ser cultivada sobre diferentes tipos de sustratos, como la membrana amniótica o las capas de células sustentadoras. Modificado a partir de: Shortt, A.J., Secker, G.A., Notara, M.D., Limb, G.A., Khaw, P.T., Tuft, S.J., Daniels, J.T., 2007. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv. Ophthalmol.* 52, 483-502.

Ambas técnicas presentan ventajas e inconvenientes. En el caso del cultivo por explante, se trata de un procedimiento bastante sencillo y mediante el cual la muestra de tejido limbar no precisa prácticamente manipulación alguna antes de ser colocada sobre la superficie de cultivo. Esto conlleva un menor riesgo en cuanto a posibles alteraciones de la superficie epitelial y por tanto de las CMEL. Como contrapartida, utilizar este tipo de técnica puede llevar al crecimiento selectivo de un tipo celular concreto de la superficie ocular ya que se produce una migración preferencial de las células del epitelio que se encuentran en la periferia del explante, lo que en cierta medida podría estar favoreciendo la proliferación y expansión de CAT y no CMEL.

En el caso del establecimiento de cultivos a partir de suspensiones celulares, es necesaria la destrucción anatómica del epitelio limbar, mediante tratamientos enzimáticos. La ventaja de este tipo de procedimientos es que al tratarse de una población de células aisladas se cree que contiene una mayor proporción de CMEL. Sin embargo, los métodos de individualización celular son bastante agresivos y parecen afectar en cierta medida a la viabilidad de las células, además de que implican la destrucción del nicho en el que se encuentran las CMEL in vivo.

Independientemente del método, durante los últimos años han ido apareciendo diversas modificaciones de las técnicas de expansión ex vivo para dichas células en función del tipo de sustrato utilizado, los medios de cultivo utilizados o los tratamientos a los que se ven sometidas las muestras tisulares previo al establecimiento de los cultivos.

De manera general, las técnicas de expansión ex vivo de las CMEL a partir de explante se basan en colocar directamente la muestra de tejido sobre la superficie de cultivo. Una variación, es la utilización de un explante constituido únicamente por la porción epitelial. En este caso, previo al establecimiento del cultivo, se precisa el tratamiento del tejido para la obtención de láminas de epitelio. Dicho tratamiento puede consistir en una separación mecánica, química (tratamiento con ácido etilendiamino tetraacético o EDTA)<sup>150</sup> o enzimática (Dispasa II)<sup>91;151</sup>.

En el caso de las suspensiones celulares, se han descrito varios protocolos para conseguir la individualización celular. La primera técnica utilizada consistió en la aplicación de un método previamente descrito por Rheinwald y Green en 1975 para el aislamiento de queratinocitos de piel <sup>152</sup>. Las muestras eran tratadas con una solución

enzimática de tripsina. Aunque por este procedimiento se conseguía una suspensión de células epiteliales, a su vez llevaba asociado el aislamiento de una cierta proporción de células fibroblásticas que interferían en el posterior cultivo del componente epitelial.

Para solventar, en la medida de lo posible, el problema de la contaminación fibroblástica se desarrollaron técnicas que perseguían el aislamiento único de las células epiteliales. El método más extendido consiste en una primera separación de la lámina epitelial del estroma subyacente mediante un tratamiento enzimático con Dispasa II y una posterior digestión de dicha lámina epitelial con tripsina para alcanzar la individualización celular<sup>117;147-149</sup>.

Independientemente del tipo de método de cultivo utilizado o de los tratamientos a los que la muestra tisular se ve sometida previo al establecimiento del cultivo, una de las claves del éxito de la expansión ex vivo de las CMEL radica en el tipo de soporte utilizado para dicha expansión.

Como se ha comentado con anterioridad, el nicho en el que las CMEL se encuentran bajo condiciones in vivo en el tejido nativo es de vital importancia para el mantenimiento de las características que las definen como célula madre adulta. De este modo, para que las CMEL puedan ser mantenidas bajo condiciones de cultivo in vitro es necesario reproducir, en la medida de lo posible, dicho microambiente.

A este respecto, se han definido distintos tipos de sustratos en los que las CMEL parecen expandirse ex vivo. Existen métodos de cultivo de las CMEL que utilizan superficies plásticas recubiertas de polímeros (fibronectina, colágeno, ...), membrana amniótica<sup>137;153;154</sup>, capas sustentadoras de fibroblastos 3T3 de ratón inactivados<sup>117</sup>, gel de fibrina<sup>124;155;156</sup>, el cristalino<sup>157</sup> o lentes de contacto<sup>158</sup>. De todos ellos, la membrana amniótica es el de aplicación más extendida, ya que parece ser que consigue la obtención de láminas de células con características de CMEL. Esta membrana puede ser utilizada de manera individual o bien en co-cultivo con células 3T3 sustentadoras, que han sido descritas como necesarias para el mantenimiento de la población de las células epiteliales.

Aún habiéndose descrito todos estos procedimientos, hasta la fecha no se ha establecido un procedimiento definitivo que asegure la correcta expansión ex vivo de las CMEL. Esto no sólo es debido a que se esté buscando el tipo de soporte adecuado, sino también al hecho de que en ausencia de un marcador definitivo para las CMEL, a

día de hoy es muy difícil poder determinar de manera fiable que las láminas celulares obtenidas a partir de los diferentes procedimientos de aislamiento y cultivo contienen realmente una población de CMEL.

Por tanto, es de vital importancia poder llegar a definir un marcador definitivo para las CMEL, que permita poder realizar una investigación más exhaustiva acerca de las condiciones de expansión necesarias para poder aplicarlas clínicamente mediante su trasplante de una manera más segura y fiable.

## **6.- INGENIERIA TISULAR Y SUPERFICIE OCULAR**

La ingeniería tisular es una disciplina que combina la aplicación de los principios y la metodología de la biología celular y molecular con la ingeniería mecánica y de materiales con el objeto principal de desarrollar nuevas posibilidades terapéuticas para la reparación o sustitución de órganos y tejidos perdidos o dañados. En los últimos años, este tipo de estrategias se han convertido en uno de los ejes centrales de la actual investigación biomédica.

Las técnicas de ingeniería tisular, básicamente, se basan en la combinación de tres tipos de componentes:

- Componente celular: células de un origen definido, viables y que no presentan potencial inmunogénico, que van a ser las encargadas, en último término, de la reposición del tejido.
- Componente "transportador": materiales que pueden actuar, bien como vehículos de liberación de células, bien como andamiajes tridimensionales que permiten una correcta expansión celular bajo condiciones de cultivo *in vitro*.
- Componente bioactivo: constituido por citoquinas u otro tipo de moléculas que estimulan y/o controlan los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular<sup>159-162</sup>.

Para llegar a alcanzar la regeneración tisular, este tipo de procedimientos se basan en tres tipos principales de estrategias que consisten en:

- Fabricación de estructuras que, mediante la combinación de una andamiaje con moléculas bioactivas, permitan la liberación controlada de éstas últimas, favoreciendo que las células presentes en un tejido concreto puedan proliferar y/o diferenciarse siguiendo un patrón determinado<sup>163</sup>.
- Desarrollo de vehículos de transporte celular (por ejemplo microcápsulas) que permitan el trasplante de una determinada población celular en un tejido dañado, persiguiendo la restauración de dicho tejido<sup>164</sup>.
- Construcción de sustitutos tisulares complejos mediante la utilización de andamiajes tridimensionales como soporte para la expansión de tipos celulares concretos, que puedan ser utilizados para su trasplante con el objeto de restaurar tejidos alterados por una patología concreta<sup>165;166</sup>.

Esta última representa la estrategia más utilizada de la ingeniería tisular, para lo cual es estrictamente necesaria la utilización de un material poroso que actúe a modo de andamiaje, favoreciendo la adhesión y colonización de la población celular. Existen una serie de requerimientos básicos que deben presentar este tipo de materiales para ser utilizados en ingeniería tisular con el fin de su posterior trasplante:

- **Biocompatibilidad:** debe tratarse de un material cuya composición química permita la adhesión del componente celular y cuya constitución estructural presente una red de poros interconectados de unas dimensiones adecuadas para la integración celular y tisular, así como para los procesos de revascularización y neurogénesis. Por otra parte, en la medida de lo posible, debe tratarse de compuestos que no desencadenen respuestas adversas tras ser implantados (biocompatibles).
- **Biodegradabilidad y biorreabsorbilidad:** suele interesar que el material, una vez implantado pueda llegar a ser reemplazado por el tejido neoformado. Aunque, sin embargo, puede plantearse el uso de materiales no reabsorbibles para determinadas situaciones.

- Propiedades mecánicas adecuadas que, por una parte, permitan su manipulación y trasplante y, por otra, se asemejen a las del tejido nativo que se pretende sustituir<sup>167</sup>.
- Fabricación fácil y económica en una variedad de formas y tamaños.

En la actualidad, se han descrito distintos biomateriales que cumplen con estas características y que pueden englobarse en dos grandes categorías en función de su origen (Tabla 2)<sup>168</sup>:

- Biomateriales sintéticos: son polímeros de composición química conocida como por ejemplo, el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), combinaciones de PGA/PLA o el polihidroxitirato (PH4B).
- Biomateriales naturales: son compuestos de origen biológico entre los que se pueden destacar el colágeno, el quitosano, el alginato o los glucosaminoglicanos.

### **6.1.- LA FIBRINA COMO BIOMATERIAL**

La fibrina es uno de los biomateriales naturales más extensamente utilizados como andamiaje en ingeniería tisular. De manera aislada o en combinación con otro tipo de materiales, la fibrina ha sido utilizada como andamiaje biológico para la regeneración de tejido adiposo, hueso, cartílago, tejido cardíaco, hígado, tejido nervioso, piel, ligamentos y tejido ocular<sup>124;169;170</sup>.

Durante varias décadas, la fibrina ha sido utilizada como sellador tisular o pegamento biológico en muchas especialidades quirúrgicas, como herramienta para colaborar en la recuperación de la homeostasis y conseguir la unión de los tejidos.

La fibrina es un polímero biocompatible y biodegradable, que presenta una estructura compuesta por una red de fibrillas entrecruzadas, adecuada para atrapar a una población celular. Por otra parte, estudios previos han demostrado que este polímero es capaz de promover la adhesión y proliferación de tipos celulares concretos, como los fibroblastos, las células de músculo liso o algunos tipos de células epiteliales. A su vez, se ha comprobado que permite que las células contenidas en su interior puedan llevar

a cabo la síntesis de su propia matriz extracelular y su posterior remodelación, actuando por tanto, como un andamiaje temporal durante el proceso de reparación de los tejidos.

	MATERIALES NATURALES	MATERIALES SINTETICOS
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mimetizan la estructura y composición de la matriz extracelular natural</li> <li>- Simulan los efectos estimulantes de la matriz extracelular nativa sobre las células</li> <li>- Permiten la incorporación de factores de crecimiento y otras proteínas de la matriz (por ejemplo colágeno) para promover aún más las funciones celulares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permiten la cinética de degradación controlada para diferentes aplicaciones</li> <li>- Poseen propiedades mecánicas para contrarrestar las fuerzas de contracción celular y permitir una fácil manipulación</li> <li>- Eliminar riesgos de transferencia de patógenos</li> <li>- Permiten la liberación controlada de factores de crecimiento</li> <li>- Permiten la formación de diferentes formas y tamaños usando varias técnicas de procesamiento</li> </ul>
INCONVENIENTES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se disuelven o degradan fácilmente, y no permiten cinéticas de degradación variadas</li> <li>- No contrarrestan las fuerzas celulares en relación a pobres propiedades mecánicas</li> <li>- Requieren técnicas de modificación y procesamiento más elaboradas en relación a ser estructuras más complejas y menos tolerantes al calor</li> <li>- Varían en la consistencia del material en relación a la variabilidad natural en la estructura molecular de los polímeros naturales</li> <li>- Posible transferencia de patógenos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No poseen capacidades de bio-inducción</li> <li>- Degradación que lleva a la formación de subproductos, que pueden dar lugar a variaciones del ambiente local</li> <li>- Requieren modificaciones de superficie para mejorar las interacciones entre las células y el material</li> </ul>

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de la utilización de biomateriales sintéticos y naturales. Tomado de: Ng, K.W., Khor, H.L., Hutmacher, D.W. 2004. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. Biomaterials 25, 2807-2818

En cuanto a su composición, los polímeros de fibrina consisten en un entramado de moléculas de fibrina entrecruzadas, que se originan mediante un mecanismo de coagulación a partir de monómeros de fibrinógeno. Esta es una proteína plasmática de elevado peso molecular (340 KDa) que está constituida por tres dominios: uno central, constituido por un fibrinopéptido E y dos pares de fibrinopéptidos A y B, y dos dominios terminales de fibrinopéptido D (Figura 11).

El fibrinógeno tiene un papel importante, no sólo en la coagulación sanguínea, sino también en los mecanismos de fibrinolisis, la interacción entre las células y la matriz

extracelular, la respuesta inflamatoria, la reparación de heridas y los procesos neoplásicos<sup>171</sup>.

El mecanismo de coagulación se ve activado por acción de una enzima, la trombina, cuya función consiste en romper los fibrinopéptidos A y B de la molécula de fibrinógeno, originándose una fibra laminar, monómero de fibrina, que tiene una gran tendencia a polimerizar, conformando el entramado de redes característico del coágulo de fibrina (procesos de fibrinogénesis) (Figura 11). El entrecruzamiento de estos monómeros se ve además catalizado por el factor XIII de la coagulación, una transglutaminasa presente en el suero que introduce uniones covalentes entre los monómeros de fibrina<sup>172</sup>. Estas uniones son las que producen una red de fibrina estable que es resistente a proteasas.

Para su utilización en ingeniería tisular, los polímeros o geles de fibrina, generalmente son preparados combinando soluciones con fibrinógeno y trombina que a su vez contienen iones calcio; éstos últimos son muy importantes, puesto que se trata de un cofactor de activación para las principales enzimas responsables del proceso de coagulación.

Los componentes principales del polímero de fibrina, fibrinógeno y trombina, pueden ser de origen comercial o, incluso, pueden ser obtenidos de una manera recombinante. De todas formas, el mayor interés de este tipo de polímeros se centra en que ambas proteínas pueden ser aisladas a partir de muestras de sangre, mediante el aislamiento de la fracción plasmática, lo que hace posible la elaboración de andamiajes de naturaleza autóloga y así, el método más común para la obtención de una solución rica en fibrinógeno a partir de la sangre de un paciente, es a partir del plasma fresco congelado<sup>173-175</sup>.

Los geles de fibrina resultantes de los procesos de coagulación inducida constan de una red fibrilar y un fluido intersticial. La interacción entre ambas fases es lo que va a determinar la resistencia y otras propiedades mecánicas de dicha estructura<sup>176</sup>.

Uno de los principales inconvenientes de la utilización de este tipo de polímeros como andamiaje en ingeniería tisular es que, potencialmente, presentan una rápida degradación (fibrinólisis). Este proceso implica la actuación de varias enzimas que en último término llevan a la activación del plasminógeno, transformándose éste a plasmina, una serinproteasa que rompe el coágulo de fibrina.

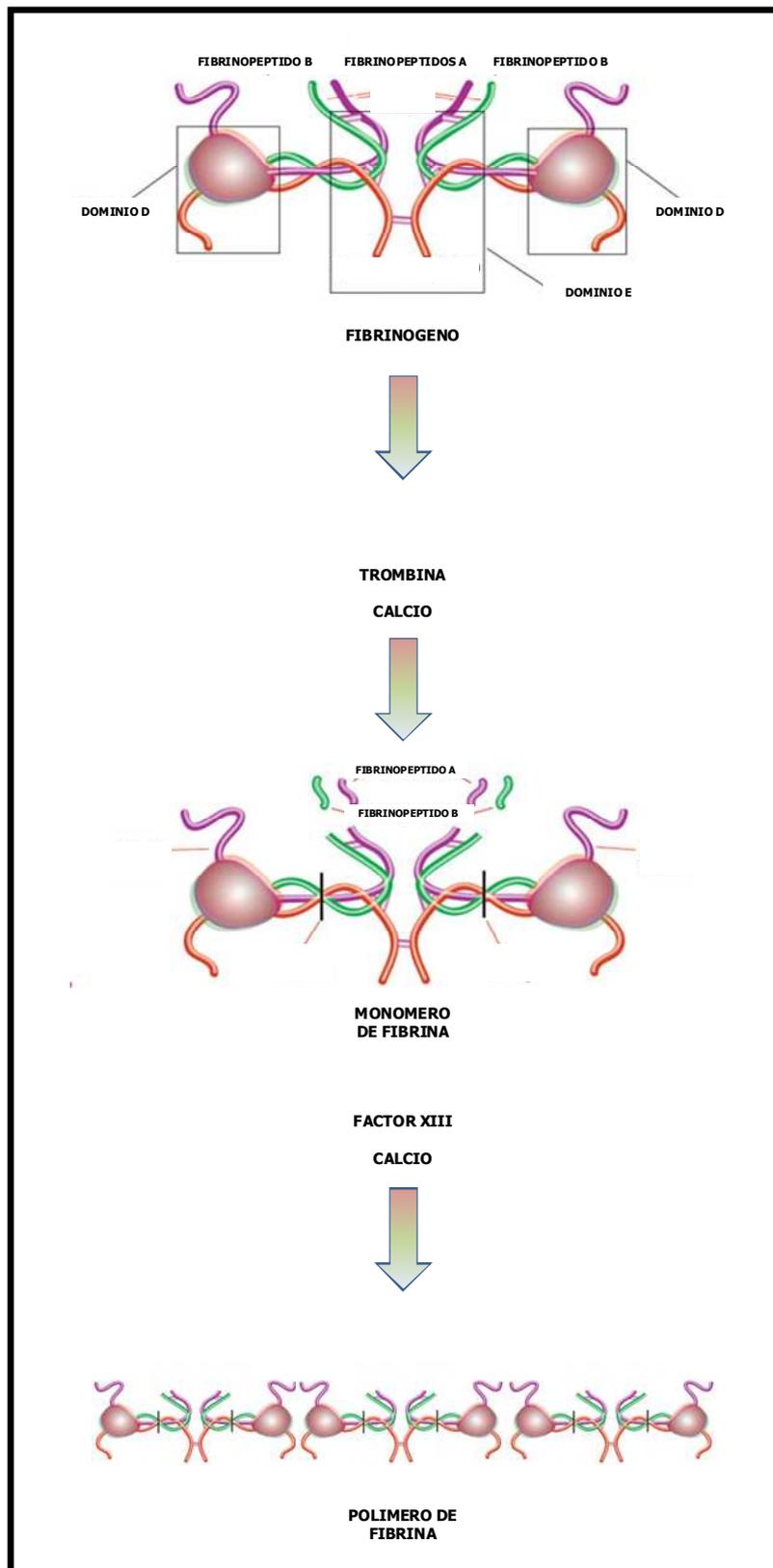


Figura 11: Estructura del fibrinógeno y mecanismo de polimerización de la fibrina. El fibrinógeno, compuesto por dos dominios D y un dominio E, por acción de la trombina, pierde los fibrinopéptidos A y B, transformándose en un monómero de fibrina que, con la ayuda del factor XIII de la coagulación, polimeriza, constituyendo el coágulo de fibrina. Todo este proceso está catalizado por el calcio.

Bajo condiciones in vitro la tasa de degradación varía en función del tipo celular y las condiciones de cultivo; la principal causa de esto es que las propias células en expansión en el interior del andamiaje de fibrina pueden sintetizar metaloproteinasas capaces de degradar la estructura<sup>177-180</sup>.

Por ejemplo, los fibroblastos degradan lentamente la fibrina<sup>177;178</sup>, mientras que la reemplazan por nueva matriz extracelular; pero en el caso de las células de músculo liso, la tasa de degradación del andamiaje es demasiado rápida en comparación a la de producción de nueva matriz extracelular, llevando a la inestabilidad<sup>179;180</sup>.

La velocidad de degradación de la matriz de fibrina puede ser controlada mediante la utilización de inhibidores<sup>179;181;182</sup>. Uno de estos inhibidores es la aprotinina, el inhibidor natural de la fibrinólisis. También existen otros compuestos, como el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, que inhibe de manera competitiva la unión de la plasmina y el plasminógeno a la fibrina<sup>179;181</sup>.

## **6.2.- APLICACIONES DE LA INGENIERIA TISULAR EN LA SUPERFICIE OCULAR**

Hasta la fecha, la aplicación de estrategias de ingeniería tisular para el desarrollo de tratamientos frente a patologías que afectan a la superficie ocular se han centrado de manera prácticamente exclusiva en la reconstrucción del tejido corneal<sup>170;183-199</sup>. En este sentido, varios grupos de investigación han desarrollado sustitutos tisulares de la córnea mediante la combinación de biomateriales como el colágeno<sup>193</sup>, la fibrina<sup>170</sup>, tejidos decelularizados<sup>186</sup> o la seda<sup>191</sup>, con los principales componentes celulares de la córnea (epitelio, queratocitos y endotelio). Aunque se ha conseguido reproducir, de una manera más o menos fiable, la estructura del tejido corneal, aún no se ha conseguido desarrollar un sustituto corneal que presente las propiedades ópticas adecuadas.

Otra de las cuestiones pendientes por desarrollar en lo referente al establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas para la superficie ocular se basa en que los estudios que persiguen la obtención de una población de CMEL expandidas ex vivo para su posterior trasplante, se han centrado únicamente en buscar las condiciones de cultivo

adecuadas (medios de cultivo, ambiente de cultivo) y en el tipo de soporte utilizado para dicha expansión.

Sin embargo, ninguno de ellos se ha planteado la reconstrucción in vitro, mediante técnicas de ingeniería tisular del tejido limbar. Esto es realmente interesante, puesto que llegar a reproducir de la manera más fiable posible el microambiente en el que las CMEL se encuentran in vivo, podría mejorar considerablemente las estrategias utilizadas hasta el momento para la expansión de las CMEL in vitro.

## **II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

El presente estudio tiene como objeto la construcción de un sustitutivo del tejido limbar (GFCL) de naturaleza totalmente autóloga, utilizando como sustrato una matriz derivada de la fibrina, que permita, por una parte, el crecimiento en su interior de las células de naturaleza fibroblástica propias del estroma limbar, y por otra, la expansión sobre su superficie de las células que constituyen el epitelio limbar. Todo esto con el fin de llegar a conformar una estructura análoga a la que sustenta a las CMEL en el tejido in vivo. Para que las CMEL en cultivo no pierdan ninguna de sus características, es de vital importancia tener en cuenta el ambiente en el que se encuentra éste tipo celular in vivo. La reproducción de ese nicho puede llegar a conseguirse mediante el cultivo de células procedentes del estroma limbar en el interior del andamiaje de fibrina, llegando a conformar una estructura análoga a la que sustenta a las CMEL en el tejido in vivo. De este modo, dicho equivalente tisular, podría ser de posible aplicación terapéutica en casos de síndrome de insuficiencia límbica.

### **1.- OBJETIVO GENERAL**

Desarrollo y caracterización de una matriz biocompatible y biodegradable, a partir de polímeros de fibrina, que en combinación con las células fibroblásticas propias del tejido limbar, permita constituir un ambiente adecuado para la expansión de las células que constituyen el epitelio limbar. Para ello, se precisa la obtención de muestras de plasma fresco congelado, y su consiguiente manipulación y estudio hasta llegar a obtener una matriz con un entramado y consistencia adecuados para el desarrollo no sólo de las células fibroblásticas anteriormente mencionadas que se pretenden incluir en esa matriz, sino también el de las células del epitelio límbico.

### **2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

A) Puesta a punto de las técnicas de digestión y cultivo, necesarias para la obtención y expansión in vitro de los componentes epitelial y estromal.

- Técnicas de digestión con soluciones de tripsina que lleven a una disgregación celular completa del epitelio limbar.

- Utilización de métodos de digestión basados en la colagenasa para la obtención de fibroblastos a partir del componente estromal de la región limbar.

B) Obtención y manipulación de polímeros de fibrina para el desarrollo de un sustrato complejo y biodegradable que sirva de soporte para la expansión de las células procedentes del tejido limbar.

- Obtención de los polímeros de fibrina a partir de plasma fresco congelado.
- Establecimiento de los parámetros idóneos de elaboración, para la obtención de una estructura tridimensional derivada de fibrina que sirva de andamiaje para el correcto desarrollo de las células en cultivo.

C) Establecimiento de la composición final de un sustitutivo estromal, GFF, mediante la inmersión en la matriz de fibrina, de células fibroblásticas propias del estroma limbar, con el fin de conseguir un ambiente lo más similar posible al que realmente tienen las CMEL en su nicho natural.

D) Construcción del sustitutivo de tejido limbar mediante la siembra y expansión de células del epitelio limbar sobre los GFF.

### **III.- MATERIAL Y METODO**

### **III.- MATERIAL Y METODO**

#### **1.- MATERIAL Y EQUIPAMIENTO**

El material empleado para la recogida, transporte y procesamiento de las muestras biológicas, así como el utilizado para llevar a cabo las técnicas de cultivo celular e ingeniería tisular descritas en el presente trabajo, fue en su mayoría material estéril de un único uso y aparece detallado en el Anexo I.

La composición de los diferentes medios de cultivo y soluciones empleadas durante todo el período del estudio se detallan en el Anexo II.

El equipamiento necesario para llevar cabo tanto la manipulación y procesamiento de las muestras biológicas, así como las técnicas de cultivo celular e ingeniería tisular se encontraba en el Laboratorio de Investigación del Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco de León.

Los estudios de microscopía láser confocal y microscopía electrónica de barrido fueron realizados utilizando los equipos disponibles en el Servicio de Microscopía de la Universidad de León.

Para llevar a cabo las técnicas de histología se utilizó el equipamiento alojado en el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Biomedicina de la Universidad de León.

#### **2.- OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

##### **2.1.- ANIMALES**

Las muestras biológicas utilizadas fueron recogidas a partir de 48 cerdos, 36 hembras y 12 machos, de raza híbrida de tipo comercial, de unas 4 semanas de edad y 20 kg de peso. Ninguno de los animales utilizados con este fin fue expresamente manipulado o eutanasiado para la recogida de los tejidos, sino que todos los sujetos empleados, para la obtención de muestras, formaban parte de otros proyectos de investigación ajenos

al presente. Ninguno de ellos, sin embargo, había sido sometido a ningún tipo de investigación que pudiese haber alterado la calidad de nuestro estudio.

El manejo de los mismos fue llevado a cabo cumpliendo con las directrices definidas por la legislación vigente, tanto a nivel nacional (Real Decreto, RD 1201/2005) como internacional (Directiva de la Comunidad Europea 2003/65/CE y las directrices de la "Association for Research in Vision and Ophthalmology Resolution on the Use of animals in Ophthalmic and Vision Research").

Todos los animales permanecieron estabulados en las instalaciones del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León y, en todo momento, fueron manipulados por personal veterinario experimentado.

Para la recogida de las muestras biológicas, los animales fueron tranquilizados mediante la inyección intramuscular de una mezcla de midazolam (0,35 mg/kg), ketamina (5 mg/kg) y atropina (0,02 mg/kg). La inducción de la anestesia se realizó mediante la administración de propofol (4-6 mg/Kg). El mantenimiento de la anestesia general se llevó a cabo vía inhalatoria con isoflurano (2%), empleando un aparato de anestesia modelo JULIAN (Dräger Medical Hispania S.A., Madrid, España).

La eutanasia de los animales fue realizada mediante la inyección intravenosa de T61 (0,3 ml/Kg).

## **2.2.- RECOGIDA DE GLOBOS OCULARES**

Para la obtención de las muestras de tejido limbar necesarias para el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron 96 globos oculares porcinos, obtenidos dentro de los 15 minutos posteriores a la eutanasia de los animales. De ellos, 75 fueron procesados para la disección de los botones esclero-corneales y los 21 restantes se utilizaron para la realización de estudios histológicos y de inmunofluorescencia. A partir de los primeros, una vez sometidos al proceso de esterilización, se obtuvieron un total de 150 muestras de tejido limbar para llevar a cabo las técnicas de aislamiento celular y el establecimiento de los cultivos primarios (P0).

Previo a la extracción del globo ocular, se llevó a cabo una inspección macroscópica del ojo de los animales, con el objeto de detectar posibles anomalías y/o lesiones de la superficie ocular que pudieran interferir con los resultados obtenidos en el estudio.

El procedimiento de extracción quirúrgica del globo ocular se realizó bajo condiciones de asepsia, utilizando material estéril. En primer lugar, se procedió a la separación de los párpados superior e inferior utilizando un blefarostato. Seguidamente, utilizando un bisturí, se realizó una peritomia conjuntival a lo largo de los 360 grados del globo ocular, guardando una distancia de unos 3 mm con respecto al limbo esclero-corneal. En todo momento, se cuidó de no lesionar el tejido limbar. Posteriormente, con ayuda de unas tijeras, se procedió a la resección de la conjuntiva, permitiendo así el acceso a los músculos extraoculares y su sección, lo más cerca posible de la zona de inserción. En último lugar, y realizando una ligera tracción y rotación del ojo, se procedió a seccionar el nervio óptico, permitiendo así la extracción del globo ocular completo de la órbita.

Los globos oculares enucleados fueron lavados con una solución de suero salino estéril para eliminar los posibles restos hemáticos y de tejido residual. Para su transporte, fueron introducidos en recipientes estériles que contenían un medio de transporte compuesto por DMEM suplementado con antibióticos (10 U penicilina/10 µg/ml estreptomicina). Todos los contenedores de transporte fueron debidamente etiquetados, especificando el animal de procedencia de la muestra y los datos referentes a la fecha y hora de enucleación. El transporte de las muestras fue realizado en condiciones de refrigeración, a una temperatura de 4°C. Los globos oculares fueron almacenados a dicha temperatura hasta el momento de su utilización, sin que transcurrieran, en ninguno de los casos, más de 4 horas desde el momento de su obtención.

### **2.3.- OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL**

Para la elaboración de los andamiajes de fibrina fue necesaria la obtención de un volumen de sangre de entre 22 y 26 ml (5 tubos), a partir de vena auricular, siempre antes de la eutanasia de los animales.

En primer lugar, se procedió a la limpieza de la zona de punción con un antiséptico (povidona yodada al 10%, Betadine®). Acto seguido, se introdujo una aguja en una de las venas auriculares y se procedió a la recogida de la sangre en tubos de vacío, con una solución de citrato sódico, a una concentración de 0.129 M, como agente anticoagulante. Los tubos recogidos, debidamente codificados (identificación del animal, fecha y hora de recogida), fueron transportados a temperatura ambiente hasta el laboratorio, donde seguidamente fueron procesados para el aislamiento y preservación de la fracción plasmática.

## **2.4.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Una vez en el laboratorio, bajo estrictas condiciones de asepsia, trabajando en campana de flujo laminar vertical (Modelo V-100, Telstar), los globos oculares y las muestras de sangre total fueron procesados como se detalla a continuación.

### **2.4.1.- OBTENCION DE MUESTRAS DE TEJIDO LIMBAR A PARTIR DE LOS GLOBOS OCULARES**

Utilizando pinzas estériles, los globos oculares fueron recuperados de los recipientes de transporte y colocados sobre una placa de Petri recubierta con una gasa de algodón, de manera que la superficie ocular quedó dispuesta hacia arriba. En primer lugar, utilizando un bisturí, se realizó una limpieza de los tejidos accesorios presentes en el globo ocular (restos de sangre, inserciones musculares, conjuntiva). Posteriormente, se procedió a la realización de una pequeña incisión a nivel escleral, a una distancia de 3 mm desde la región limbar, hasta llegar al espacio supracoroideo, utilizando una cuchilla de bisturí curvada del número 12. A partir de dicha incisión y utilizando unas tijeras de rama izquierda, se fue recortando el botón esclero-corneal alrededor de toda la periferia corneal (Figura 12 A, B).

Los botones esclero-corneal recuperados fueron, seguidamente, sometidos a un breve proceso de esterilización. En primer lugar, las muestras fueron sumergidas durante 2 minutos en 20 ml de medio de lavado compuesto por una base de DMEM suplementado con 10 U penicilina / 10 µg estreptomina por ml. Acto seguido, las

muestras fueron introducidas durante 30 segundos en un recipiente con una solución de etanol al 50% en suero fisiológico estéril. Para finalizar, se procedió a la realización de dos nuevos lavados consecutivos, de 2 minutos de duración cada uno, en DMEM suplementado con antibióticos (Figura 12 C).

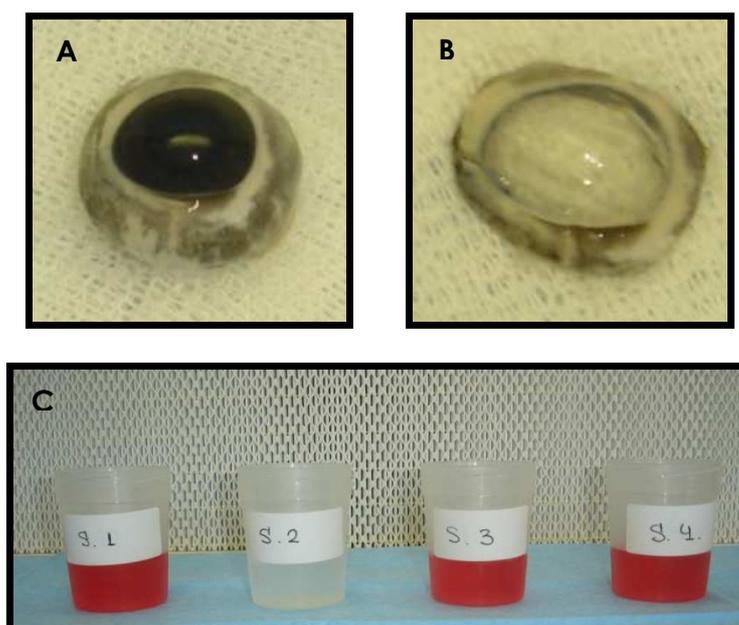


Figura 12: Procesamiento de los globos oculares. (A) Globo ocular porcino tras la limpieza de los restos hemáticos, conjuntiva, inserciones musculares y nervio óptico. (B) Aspecto del botón esclero-corneal tallado a partir del globo ocular. (C) Todos los botones esclero-corneales recogidos fueron sometidos a un proceso de esterilización, consistente en la inmersión de dichos botones en soluciones de DMEM suplementado con antibióticos (S1, S3 y S4) y etanol al 50% (S2) .

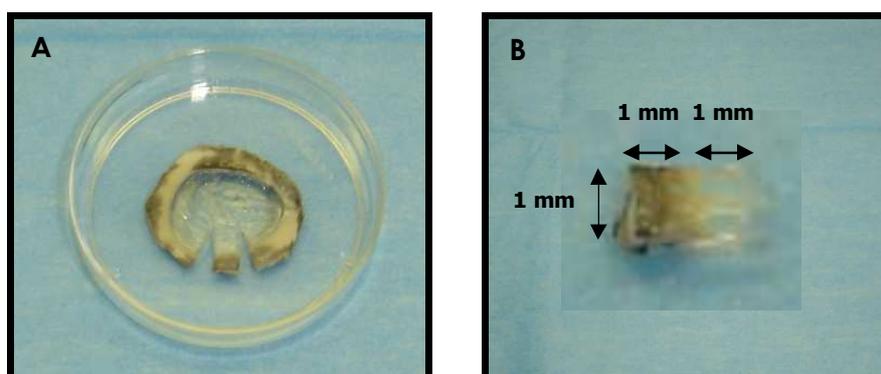


Figura 13: Recogida de la muestra de tejido limbar. (A) A partir de los botones esclero-corneales esterilizados, fue recogida una pequeña muestra de tejido limbar, de unos 2 mm de ancho, incluyendo 1 mm de córnea y esclera, respectivamente, de la región limbar superior. (B) Aspecto de la muestra de tejido limbar recogida.

A partir de los botones corneo-esclerales esterilizados, y previa limpieza de los restos de tejido uveal, se procedió a la obtención de 150 biopsias de la región limbar superior, de 1 mm de ancho, recortando con la ayuda de un bisturí a 1 mm del limbo desde esclera y córnea, respectivamente (Figura 13A y 13B ).

#### **2.4.2.- AISLAMIENTO Y PRESERVACION DE PLASMA**

Para el aislamiento de la fracción plasmática del resto de componentes sanguíneos (eritrocitos, plaquetas y células de la serie blanca), las muestras de sangre total recogidas fueron sometidas a un proceso de centrifugación a una velocidad de 3.000 rpm durante 30 minutos. Tras dicho proceso, y en ambiente estéril, el plasma (13-16 ml) fue recuperado en alícuotas de 5 ml, en tubos de polipropileno estériles. Todas ellas fueron debidamente identificadas y congeladas a -20°C; temperatura a la que fueron mantenidas hasta el momento de su utilización.

De todas las muestras de plasma procesadas fue recogida una pequeña muestra de 50 µl que se usó para la determinación de la concentración de fibrinógeno, en mg/dl, utilizando un analizador automático de coagulación (Sysmex CA-500 Series, Embee Diagnostics). En todos los casos, se obtuvo una concentración de fibrinógeno de entre 200 y 350 mg de fibrinógeno/dl de plasma.

#### **2.5.- ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS**

Con el objeto de asegurar que todas las muestras procesadas se encontraban libres de agentes microbianos, se realizaron una serie de controles microbiológicos rutinarios, testando el posible crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, y hongos.

A partir de los botones esclero-corneales, se recogió una pequeña muestra de tejido que fue introducida en caldo de tioglicolato. Las muestras fueron incubadas en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días. Tras ese tiempo, se consideraron libres de contaminación todas aquellas muestras en las que el caldo de tioglicolato aparecía libre de turbidez. A su vez, todas las soluciones utilizadas en el procedimiento de esterilización de los botones procedentes de los globos oculares fueron inoculadas en

frascos de hemocultivo específicos para el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios (BacT/ALERT® SA y SN). En este caso, para la incubación y el control del crecimiento bacteriano se utilizó un sistema automatizado de control de cambios en la turbidez de los medios de cultivo (modelo miniVital, Biomérieux, Francia). Se consideraron estériles todas aquellas muestras en las que no se observó crecimiento de microorganismos tras 7 días de incubación.

En el caso de las muestras de plasma, en el momento de la realización de las alícuotas se recogió una muestra de 1 ml en un tubo eppendorf estéril. A partir de dicha muestra, utilizando un asa de siembra calibrada de 10 µl se procedió a su inoculación en caldo de tioglicolato y medios sólidos específicos. Así, una vez que el asa de siembra fue sumergida en el tioglicolato, ésta se utilizó para la realización de siembra por estriación de cuatro placas de medios sólidos: agar sangre de cordero al 5% (COS), agar sangre Columbia-ácido nalidíxico (CNA), agar McConkey (McC3) y agar Sabouraud-cloranfenicol-gentamicina (SCG).

Las muestras fueron introducidas en un incubador a una temperatura de 37°C, y se mantuvieron bajo estas condiciones durante 3 días en el caso de los medios COS, CNA y McC3, mientras que en el caso de las muestras inoculadas en medio SCG el tiempo de incubación fue de 7 días.

Cualquier tipo de crecimiento microbiano observado en estos medios a lo largo del período de incubación, conllevó la eliminación de la muestra original del estudio.

### **3.- TECNICAS DE CULTIVO CELULAR**

Todo el proceso de manipulación necesario para el desarrollo de los cultivos celulares bajo condiciones in vitro fue desarrollado bajo estricta asepsia, para evitar, en la medida de lo posible, la aparición de contaminaciones que derivaran en la pérdida de los cultivos. Por esta razón, en todo momento, se trabajó en campana de flujo laminar vertical y todas las soluciones y materiales utilizados para el establecimiento y desarrollo de los cultivos fueron filtradas y esterilizados, respectivamente.

### **3.1.- TECNICAS DE DIGESTION**

Con el objeto de separar los dos principales componentes celulares que constituyen el tejido limbar (células epiteliales y estromales) se estudió la acción de dos protocolos de digestión de las muestras tisulares, determinando su efectividad en cuanto a capacidad de aislamiento e individualización de ambas poblaciones celulares.

Ambos protocolos se basaron en la acción secuencial de dos enzimas; por un lado la tripsina, cuya acción combinada con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) persiguió el aislamiento de las células que constituyen el epitelio limbar y, por otra parte, la colagenasa, cuya acción proteolítica sobre la matriz del estroma limbar, principalmente de naturaleza colágena, permite el aislamiento de las células de naturaleza mesenquimal que se encuentran dispersas en él.

#### **3.1.1.- PROTOCOLO ESTANDAR (Pest)**

Setenta y cinco muestras de tejido limbar fueron digeridas siguiendo un protocolo descrito previamente y que se muestra en la figura 14<sup>124</sup>. La biopsia fue colocada en una placa de Petri estéril de 35 mm de diámetro y sobre ella se añadieron 2,5 ml de solución de tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02% (T/E). Las muestras fueron incubadas en estufa (Forma 311, Thermo Fisher Scientific) a una temperatura de 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. A los 30 minutos, la acción de la tripsina fue neutralizada mediante la adición de 2,5 ml de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Tras la realización de un pipeteo vigoroso de la mezcla, ésta (5ml) fue recuperada en un tubo de centrifuga de polipropileno estéril, dejando el resto del tejido en la placa de Petri, sobre el que nuevamente se añadieron 2,5 ml de solución fresca de T/E y se procedió a la re-incubación en estufa. Este proceso de neutralización y recuperación se repitió un total de 4 veces (tiempo total de digestión 2 horas). El volumen final de la solución recuperada (20 ml), fue sometido a una centrifugación a temperatura ambiente a 1.400 rpm, durante 10 minutos, al término de la cual, el sobrenadante fue aspirado y el pellet resultante fue resuspendido en un volumen conocido de medio de cultivo para células epiteliales (MCE).

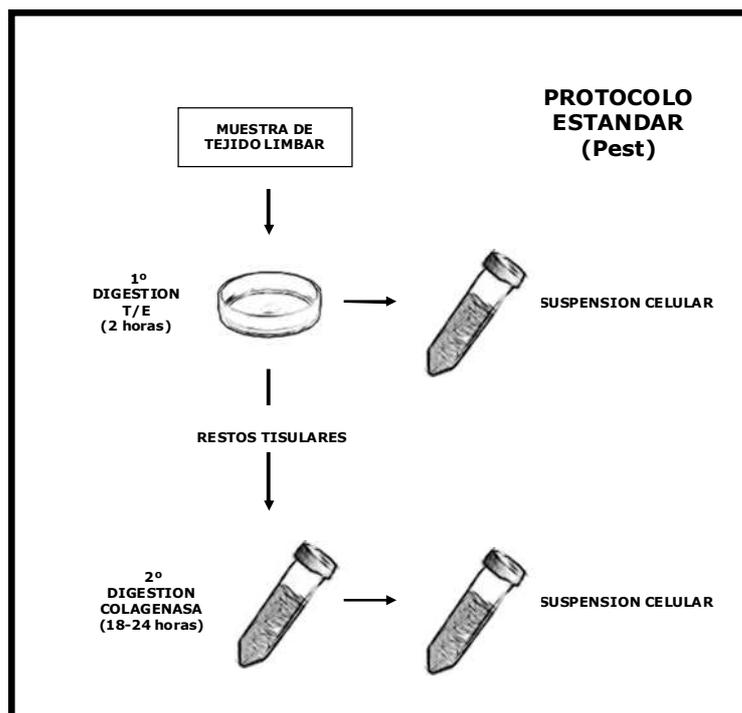


Figura 14: Diagrama del protocolo estándar (Pest). En primer lugar la muestra fue digerida utilizando soluciones de tripsina combinada con el EDTA (T/E), durante un período de 2 horas. Los restos tisulares que permanecieron sin digerir fueron recuperados y sometidos a un segundo paso de digestión de entre 18 y 24 horas con una solución de colagenasa de tipo I. Las suspensiones celulares obtenidas de los pasos 1 y 2, fueron recuperadas para el posterior establecimiento de los cultivos primarios.

El tejido restante, no digerido por acción de la tripsina, fue recuperado con ayuda de unas pinzas estériles y colocado en un tubo de polipropileno estéril de 50 ml. Sobre dichos restos se añadieron 5 ml de solución de colagenasa de tipo I a una concentración de 2 mg/ml en DMEM, y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 18-24 horas, hasta la completa disgregación de la muestra. La solución obtenida fue centrifugada a 1.400 rpm durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en un volumen conocido de medio de cultivo para células de naturaleza fibroblástica (MCF).

### 3.1.2.- PROTOCOLO INVERTIDO (Pinv)

Como alternativa al Pest descrito anteriormente y siguiendo una modificación personal, el protocolo invertido o Pinv, 75 muestras fueron sometidas a un procedimiento de

digestión que básicamente consistió en una inversión del orden de actuación de las enzimas utilizadas en el Pest (Figura 15).

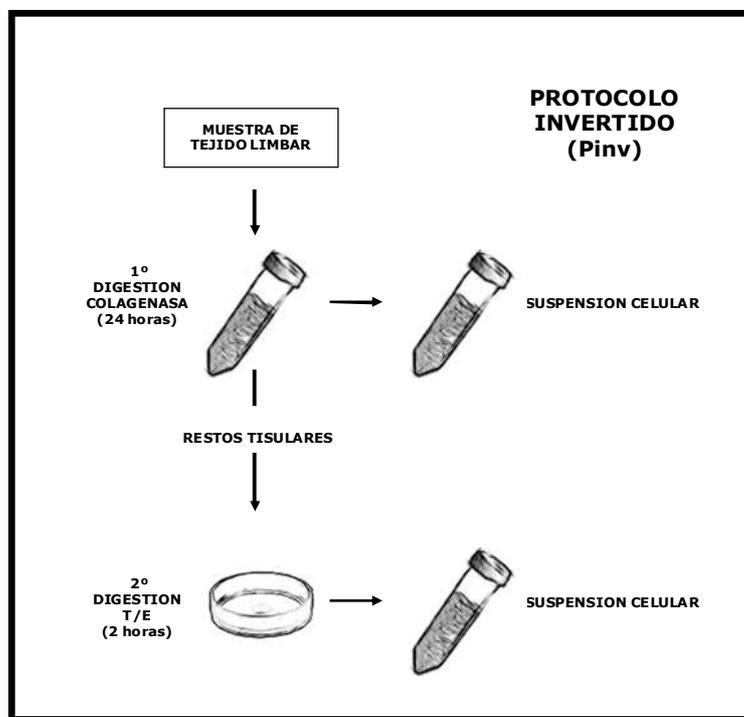


Figura 15: Diagrama del protocolo invertido (Pinv). En primer lugar la muestra fue digerida durante 24 horas utilizando una solución de colagenasa de tipo I. Los restos tisulares que permanecieron sin digerir fueron recuperados y sometidos a un segundo paso de digestión de 2 horas con una solución de tripsina combinada con EDTA (T/E). Las suspensiones celulares obtenidas de los pasos 1 y 2, fueron recuperadas para el posterior establecimiento de los cultivos primarios.

En primer lugar, las muestras de tejido limbar fueron colocadas en tubos de polipropileno en contacto con 5 ml de solución de colagenasa tipo I (2 mg/ml) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras dicho período, la mezcla fue sometida a un fuerte pipeteo para facilitar la individualización de las células aisladas por la actividad enzimática. La solución recuperada fue centrifugada a 1.400 rpm durante 10 minutos y una vez retirado el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en MCF.

En un segundo paso, los restos de tejido que permanecían sin digerir fueron recuperados y depositados en una placa de petri de 35 mm de diámetro y sometidos a tripsinización, como se ha detallado en el apartado anterior (3.1.1). La solución

obtenida tras esta digestión fue sometida a centrifugación, bajo las condiciones ya detalladas, y el pellet de células recuperado fue resuspendido en MCE.

### **3.2.- CUANTIFICACION CELULAR Y ESTIMACION DE LA VIABILIDAD**

Para llevar a cabo la cuantificación celular y la determinación del porcentaje de viabilidad celular en las suspensiones celulares obtenidas tras los procedimientos de digestión, tanto de las muestras biológicas, como de las células digeridas para la realización de los subcultivos, se utilizó una cámara de Neubauer y el método del azul Trypan.

A partir de los pellets de células resuspendidos en un volumen de medio de cultivo conocido, y tras una correcta homogeneización de la muestra mediante pipeteo, se recogió una alícuota de 10 µl de la suspensión celular en un microtubo eppendorf de 0,5 ml. Seguidamente, se añadió el mismo volumen de colorante (azul Trypan) y se mezcló bien, realizando por tanto, una dilución 1:1 de la suspensión celular original. A continuación se procedió a cargar un volumen de 10 µl de la mezcla en cada una de las partes, superior e inferior, de la cámara de contaje, a la que previamente se había fijado un cubreobjetos de vidrio.

La observación de la cámara se realizó bajo microscopio óptico invertido a 10 aumentos. Para cada muestra, se realizó el contaje de 8 campos, obviando las células que se encontraban en los bordes internos del cuadrante.

El número total de células existentes en la suspensión celular original fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Nº de células totales} = [(\text{recuento celular} \times 2 \times \text{volumen de resuspensión}) / 8] \times 10^4$$

Asimismo, para la determinación de la viabilidad celular, se estimaron como viables todas aquellas células que, bajo el microscopio, aparecían con aspecto brillante, y fueron definidas como no viables las células que, por presentar defectos en su membrana plasmática, habían tomado el colorante y presentaban un color azulado. La estimación del porcentaje de viabilidad de las células presentes en la suspensión se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

---

% de viabilidad = (nº de células contadas vivas / nº de células totales) x 100

### **3.3.- ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS**

Con el objeto de expandir las poblaciones celulares obtenidas tras los protocolos de digestión detallados anteriormente, las suspensiones celulares (n=150 para ambos, Pest y Pinv) fueron sembradas en recipientes plásticos de poliestireno de 1,9 cm<sup>2</sup> de superficie a una densidad inicial de 1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> (P0).

Todos los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de incubación controladas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera humidificada (95% de humedad). Los cambios de medio fueron realizados cada 2-3 días. Diariamente, se realizó un seguimiento de la evolución de los cultivos utilizando un microscopio óptico invertido.

El porcentaje de cultivos primarios exitosos establecidos a partir de las suspensiones celulares obtenidas de cada uno de los protocolos de digestión fue calculado como:

% de P0 exitosos = (número de cultivos exitosos/número total de cultivos) x 100

#### **3.3.1.- CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES**

Las suspensiones celulares obtenidas tras los pasos de tratamiento de las muestras biológicas con solución de T/E, de ambos protocolos de digestión (n=75 para Pest y Pinv respectivamente), fueron cultivadas utilizando un MCE compuesto por una base de Ham's F12:DMEM (1:1), suplementada con suero bovino fetal, L-glutamina y penicilina/estreptomina como aditivos básicos. La composición final de dicho medio fue definida por la adición de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y toxina cólica como agentes mitogénicos para la población epitelial, e insulina, con el fin de aumentar el porcentaje de supervivencia y adhesión de las poblaciones celulares sembradas.

Las células fueron mantenidas bajo estas condiciones durante aproximadamente 14 días, tiempo necesario para que los cultivos alcanzaran el estado de confluencia.

### **3.3.2.- CULTIVO DE CELULAS ESTROMALES**

En el caso de las poblaciones celulares aisladas del tejido limbar mediante incubación con colagenasa de tipo I siguiendo el Pest (n=75) o el Pinv (n=75), el cultivo se llevó a cabo en contacto con un medio de cultivo específico, MCF. Dicho medio estaba compuesto por una base de DMEM suplementado con suero bovino fetal, L-Glutamina y penicilina/estreptomicina.

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones in vitro entre 7 y 10 días hasta que alcanzaron el estado de confluencia.

### **3.4.- REALIZACION DE SUBCULTIVOS**

Una vez que los P0 alcanzaron el estado de confluencia, se procedió a la recuperación e individualización de las células de los recipientes de cultivo. Los P0 de células epiteliales se utilizaron para la elaboración de los sustitutos limbares (GFCL) y los P0 de células de naturaleza estromal se subcultivaron (P1) para obtener un número suficiente de células que permitiera elaborar los sustitutos estromales (GFF) y realizar los estudios de caracterización celular.

En primer lugar, se procedió a la retirada del medio de cultivo, teniendo precaución de no levantar parte de la monocapa celular existente. Acto seguido, se realizaron dos lavados sucesivos de los recipientes de cultivo con PBS estéril a pH 7,4, para eliminar los posibles restos de medio cultivo. A continuación, se añadieron 0,5 ml de una solución de T/E (0,02%/0,05%), y los cultivos se incubaron en contacto con dicha solución durante 5 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad. Tras dicho período de incubación, la solución de digestión fue neutralizada mediante la adición de 0,5 ml de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal a una concentración del 10%. Tras un vigoroso pipeteo, para facilitar el despegado y la individualización celular, la suspensión celular obtenida fue recuperada en un tubo de polipropileno estéril. Las muestras fueron centrifugadas a 1.400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras dicho procedimiento, el sobrenadante fue retirado por aspiración y el pellet aislado fue resuspendido en un volumen de medio de cultivo

conocido para proceder a la cuantificación celular y la estimación del porcentaje de viabilidad.

Para el establecimiento de los P1 de las células estromales, las suspensiones celulares obtenidas a partir de la tripsinización del P0 fueron sembradas en superficies plásticas de poliestireno a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se añadió MCF. Los P1 de células estromales se mantuvieron bajo condiciones in vitro hasta que alcanzaron el estado de confluencia, momento en el que fueron recuperadas y utilizadas para la elaboración de los sustitutos estromales (GFF).

La proliferación de ambos tipos celulares fue cuantificada en función de su tasa de expansión (TEx), calculada como:

$$TEx = \text{densidad celular final} / \text{densidad celular inicial}$$

### **3.5.- ENSAYOS DE MULTIPOTENCIALIDAD DE LA POBLACION ESTROMAL AISLADA DEL TEJIDO LIMBAR**

Con el fin de demostrar la capacidad de diferenciación asociada a las células de naturaleza mesenquimal aisladas del estroma limbar, se llevaron a cabo estudios de multipotencialidad sobre dicha población celular. Estos estudios consistieron en la comprobación de si, bajo condiciones de cultivo específicas, las células eran capaces de adquirir el fenotipo propio de otros tipos celulares del mismo linaje: osteocitos, adipocitos y condrocitos.

Para llevar a cabo esa inducción de diferenciación, las células procedentes de los P0 de la población estromal fueron sembradas en pocillos de 1,9 cm<sup>2</sup> de superficie a una densidad celular de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en contacto con medio específico para células de naturaleza fibroblástica. Dichas células fueron mantenidas bajo condiciones controladas de cultivo in vitro hasta que alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 70%, momento en el que el medio de cultivo fue sustituido por medios de inducción de diferenciación específicos:

- La diferenciación adipogénica fue estimulada utilizando un medio suplementado con insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina e indometacina (MCIA)<sup>200</sup>.
- La inducción de diferenciación osteogénica se llevó a cabo utilizando un medio suplementado con dexametasona, ácido ascórbico, y  $\beta$ -glicerolfosfato (MCIO)<sup>201</sup>.
- La diferenciación condrogénica fue inducida mediante el cultivo de las células estromales en contacto con un medio específico enriquecido con agentes inductores de la condrogénesis: insulina, factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y ácido ascórbico (MCIC)<sup>202</sup>.

Para la realización de este ensayo de multipotencialidad, se sembraron al menos dos pocillos de cada muestra de suspensión de células estromales, por cada condición de diferenciación (es decir, un total de 6 pocillos), además del mismo número de pocillos control, que se mantuvieron bajo condiciones in vitro en contacto con MCF. Dichos ensayos fueron realizados para un número total de 30 muestras.

Una vez que los cultivos se pusieron en contacto con los medios de diferenciación, se realizaron cambios de medio cada 2-3 días, manteniendo a las células en contacto con el medio de diferenciación, o en el caso de los controles con el MCF, durante 21 días. Durante todo este período se realizó un seguimiento de la evolución de los cultivos utilizando un microscopio óptico invertido.

#### **4.- CONSTRUCCION DE SUSTITUTIVOS LIMBARES (GFCL)**

Para la construcción, mediante técnicas de ingeniería tisular de los GFCL, se combinaron tres componentes biológicos: el plasma fresco congelado, la población de células epiteliales y la población de células estromales procedentes del mismo animal (Figura 16).

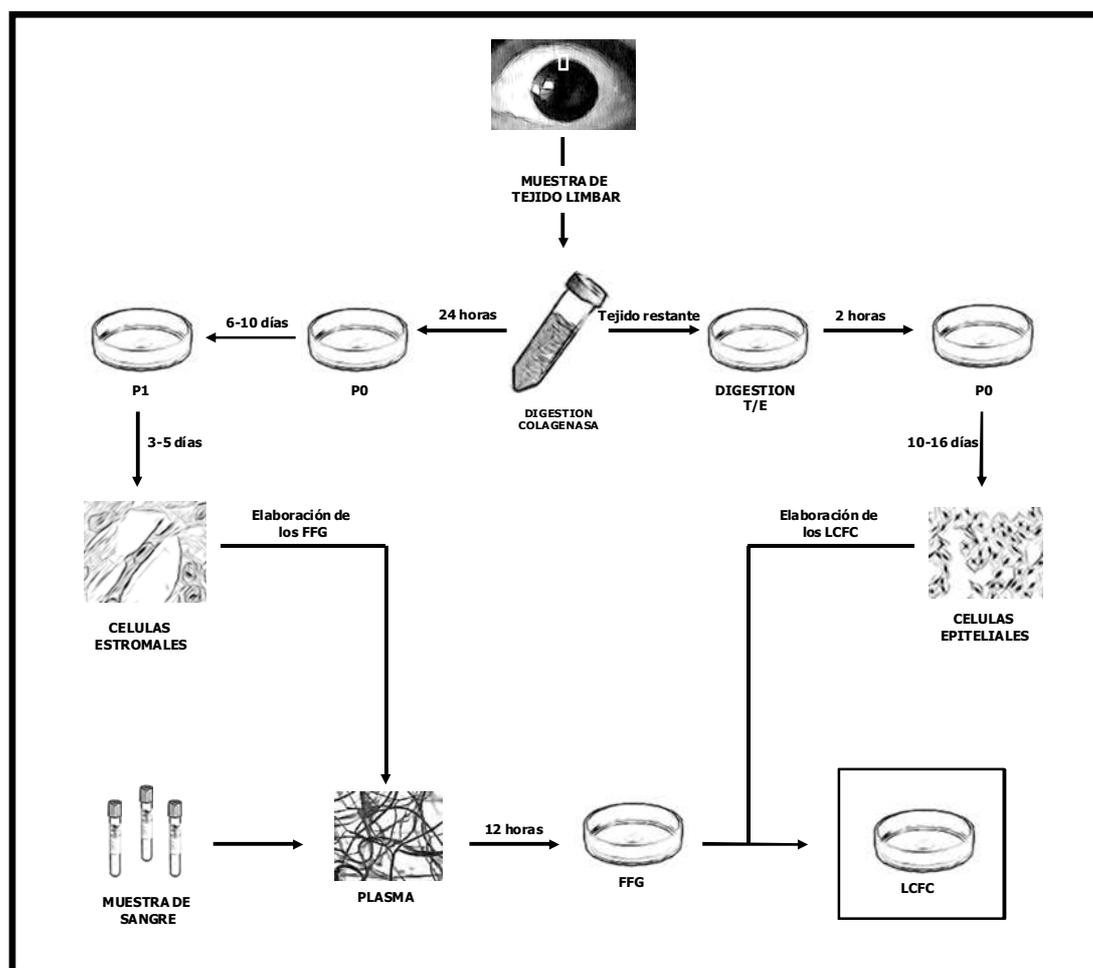


Figura 16: Representación esquemática del procedimiento de elaboración de los sustitutos limbares (GFCL). A partir de las biopsias de tejido limbar, tras la digestión de colagenasa y tripsina combinada con EDTA (T/E), fueron aisladas y cultivadas células de naturaleza estromal y epitelial, respectivamente. Una vez que las poblaciones celulares alcanzaron el tamaño adecuado, las células de naturaleza estromal procedentes del P1 fueron embebidas en plasma de origen autólogo, constituyéndose así el sustituto estromal (GFF). Sobre éste, en último lugar, fueron sembradas las células epiteliales procedentes del cultivo primario (P0), completándose así el GFCL.

En primer lugar, se procedió a la construcción de un sustituto estromal o gel de fibrina que contiene fibroblastos (GFF) utilizando como andamiaje la fibrina presente en las muestras de plasma la cual, una vez polimerizada, mediante un proceso de coagulación fisiológico, sirvió de soporte estructural para la expansión tridimensional de la población de células de naturaleza estromal. Dicho sustituto estromal se construyó con la intención de mimetizar, en la medida de lo posible, al componente estromal sobre el que se asientan, en el tejido nativo, las células del epitelio limbar. Por último, para llegar a la construcción del sustituto del tejido limbar completo o gel

de fibrina que contiene células del limbo (GFCL), el tercer y último de los componentes, la población de células epiteliales, fue sembrado sobre los GFF.

A continuación, en los siguientes apartados, se detallan, de manera específica, tanto los procedimientos seguidos para la construcción de los sustitutivos, como los posteriores estudios realizados sobre los mismos.

#### **4.1.- ESTUDIOS DE POLIMERIZACION DE LOS GELES DE FIBRINA**

Para la determinación de la formulación más idónea en la elaboración de los geles de fibrina, se llevaron a cabo estudios de coagulación a diferentes concentraciones de cloruro cálcico y ácido tranexámico, utilizando además como líquido base bien suero fisiológico o bien MCF.

Se estudiaron los tiempos de coagulación en base a la variación de los siguientes parámetros:

- Concentraciones de cloruro cálcico de 4mg/ml y 8 mg/ml.
- Concentraciones de ácido tranexámico de 40 µg/ml y 80 µg/ml.
- Suero fisiológico o MCF como medio base del gel de fibrina.
- Cantidad de plasma constante (400 µl/ml).
- Temperatura de incubación: controlada en estufa a 37°C y a temperatura ambiente.

Se realizó un control visual de la gelificación de la mezcla, recogiendo los tiempos a los que se producía la coagulación. A su vez, fue estimada la posible variación de la consistencia de los geles.

#### **4.2.- ELABORACION DE LOS SUSTITUTIVOS ESTROMALES O GFF**

Los GFF fueron preparados utilizando como base un método ya descrito<sup>203</sup>. Sobre una mezcla de plasma fresco congelado (400 µl/ml de GFF) y MCF (volumen en función de la cantidad final de mezcla elaborada), suplementada con ácido tranexámico (40 µg/ml) como agente para la prevención de la fibrinólisis del gel de fibrina, se añadieron

---

$1 \times 10^4$  fibroblastos limbares recuperados del P1. Finalmente, para activar el mecanismo de coagulación y conseguir la gelificación de la mezcla, se añadió cloruro cálcico (4 mg/ml). Una vez que la polimerización fue activada, la mezcla fue sembrada en placas multipocillo de 24 pocillos a razón de 1 ml por pocillo, y se dejó solidificar en estufa, a 37°C durante 15-30 minutos. Los GFF sólidos se dejaron estabilizar en la estufa durante 24 horas, para asegurar la adhesión de los fibroblastos al entramado de fibrillas de fibrina.

#### **4.3.- ELABORACION DE LOS SUSTITUTIVOS LIMBARES O GFCL**

Para la elaboración de los GFCL, sobre los GFF estabilizados se sembraron células de epitelio limbar procedentes del P0 confluyente a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos fueron cubiertos con 250 µl de MCE. La construcción se mantuvo bajo condiciones in vitro, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad, el tiempo necesario para que una monocapa confluyente de células epiteliales cubriera toda la superficie del GFCL.

Diariamente, se controló la progresión de la cobertura epitelial de la superficie del GFCL utilizando un microscopio óptico invertido.

### **5.- CARACTERIZACION CELULAR**

#### **5.1.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS ESPECIFICOS. TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Con el fin de poder determinar la naturaleza, epitelial o estromal, de las células aisladas y cultivadas a partir de las muestras de tejido limbar, así como para comprobar que las condiciones de cultivo no alteraban el fenotipo característico de las poblaciones celulares, se realizaron estudios cualitativos de expresión de antígenos específicos mediante técnicas de inmunofluorescencia.

### **5.1.1.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS CONTROL DE LIMBO PORCINO**

Con el objeto de poder definir tanto la reactividad de los anticuerpos utilizados, como el patrón de expresión de dichas proteínas en el tejido limbar del cerdo, se llevó a cabo un ensayo de la expresión de los marcadores proteicos elegidos sobre secciones obtenidas de la región limbar, a partir de globos oculares de origen porcino.

Para ello, se recogieron 10 globos oculares de cerdo que fueron procesados y preparados para la obtención de secciones histológicas de la superficie ocular sobre las que realizar los estudios de expresión proteica. En primer lugar, los globos oculares frescos fueron incluidos en OCT sobre gradillas metálicas y congelados a una temperatura de -20°C. Utilizando un criostato, se obtuvieron secciones de 8 µm de espesor. Las secciones fueron recogidas en portaobjetos tratados, previamente atemperados a temperatura ambiente, para facilitar la recogida de los cortes. Inmediatamente después, las muestras fueron sumergidas en acetona para su fijación. Las secciones, una vez fijadas, fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta el momento de su utilización.

### **5.1.2.- PROCESAMIENTO DE LAS CELULAS EN CULTIVO**

Para llevar a cabo los estudios de expresión proteica sobre las poblaciones celulares cultivadas in vitro, parte de las suspensiones celulares obtenidas tras los protocolos de digestión de las biopsias limbares, así como de los P0 de las células epiteliales, y los P0 y P1 de las células estromales, fueron sembradas en cámaras de cultivo celular de 8 pocillos a una densidad inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones de incubación específicas para cada tipo celular el tiempo necesario hasta que alcanzaron un estado de confluencia del 70-80%. Tras este período, fueron procesadas para la posterior realización de los ensayos de inmunofluorescencia.

En primer lugar, el medio de cultivo fue retirado por aspiración y se procedió al lavado de los pocillos con PBS. Seguidamente, las células fueron fijadas utilizando una mezcla de metanol-acetona (1:1) a una temperatura de -20°C durante 20 minutos. A continuación, la solución de fijador fue retirada y se permitió la evaporación de los

restos de dicha solución a temperatura ambiente. En último lugar y para asegurar la correcta preservación de las muestras, éstas fueron selladas con parafilm y preservadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **5.1.3.- PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA Y ANTICUERPOS UTILIZADOS**

En primer lugar, las muestras a estudiar (células o secciones de tejido) fueron descongeladas a temperatura ambiente. Acto seguido, se realizaron tres lavados consecutivos de las muestras con PBS, de 5 minutos de duración cada uno, tras los cuales se procedió a la incubación de las muestras con una solución de Morpho Save al 1% en agua destilada durante 15 minutos. Tras tres nuevos lavados con PBS, de 5 minutos de duración, las muestras fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 en PBS al 0,3% durante 10 minutos. Nuevamente se procedió a la realización de un lavado con PBS para eliminar los restos de detergente. Para evitar posibles reacciones inespecíficas, el siguiente paso consistió en una incubación de las muestras en contacto con una solución de bloqueo, compuesta por suero de burro al 5% en PBS, durante 1 hora. A continuación, se procedió a la adición de los anticuerpos primarios, dirigidos frente a los antígenos cuya expresión se pretendía estudiar, realizando diluciones de los mismos en PBS tal y como se detalla en la Tabla 3, añadiendo 100 µl en el caso de las secciones de tejido ocular y 50 µl/pocillo en el caso de las cámaras de cultivo. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente y en el interior de una cámara húmeda. Tras ese tiempo, se procedió a la realización de un nuevo lavado de las muestras con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios generados en burro (1:300). En el caso de las muestras incubadas con los anticuerpos primarios frente a alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y pan-citoqueratina, dicho anticuerpo secundario se trataba de un anti-ratón, mientras que para el resto, el secundario utilizado fue un anti-conejo; ambos conjugados con Alexa Fluor 488. La incubación con dichos anticuerpos secundarios se llevó a cabo en condiciones de humedad y oscuridad, durante 1 hora a temperatura ambiente. Para los controles negativos, en lugar de la adición del anticuerpo primario correspondiente, las muestras se incubaron en contacto con la solución de bloqueo.

Los núcleos celulares fueron contrastados con yoduro de propidio (1:1000) durante 10 minutos. Finalmente, las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia y se visualizaron utilizando un microscopio láser confocal (Radiance 2000, BIORAD).

Para cada uno de los marcadores utilizados fueron estudiadas 3 muestras. La intensidad de fluorescencia verde asociada a la expresión de los antígenos específicos por parte de las células fue graduada tras la visualización bajo el microscopio de 4 campos a una magnificación de 20x. Dicha intensidad fue definida, semi-cuantitativamente, de la siguiente manera: ++ (intensidad fuerte), + (intensidad moderada), (+) (intensidad leve) y – (no existía fluorescencia verde).

ORIGEN	ANTIGENO	DILUCION	ESPECIFICIDAD
Conejo	ALDH1A1	1:50	Queratocitos corneales (fibroblastos estromales)
Ratón	$\alpha$ -SMA	1:50	Miofibroblastos
Conejo	Colágeno tipo II	1:15	Diferenciación celular Síntesis de matriz extracelular
Conejo	Conexina 43	1:500	Uniones de tipo "gap"
Conejo	Desmoplaquina	1:200	Proteína constituyente de los desmosomas
Conejo	Integrina $\beta$ 1	1:50	Proteína constituyente de receptores de superficie celular Células mesenquimales
Ratón	Pan-citoqueratina	1:50	Células epiteliales

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para los estudios de inmunofluorescencia. (ALDH1A1: aldehído deshidrogenasa 1A1,  $\alpha$ -SMA: alfa-actina de músculo liso).

## 5.2.- ESTUDIOS DE DIFERENCIACION DE LA POBLACION ESTROMAL

Para definir la capacidad de las células aisladas del estroma limbar de adquirir fenotipo de células adiposas, óseas y de cartílago, bajo las condiciones de inducción de diferenciación in vitro descritas en el apartado 3.5, se llevaron a cabo las técnicas de tinción que se describen a continuación.

### **5.2.1.- DIFERENCIACION OSTEOGENICA**

Con el fin de determinar la respuesta de las células en cultivo al MCIO, se procedió a estudiar la aparición de depósitos de mineral en el cultivo. Para ello, se llevó a cabo la tinción de las muestras con una solución de "alizarin red" al 0,5 % a pH 4.0 (n=30).

En primer lugar, se procedió a retirar el medio de cultivo y tras dos lavados consecutivos con PBS, las células fueron fijadas durante 30 minutos a una temperatura de 4°C con metanol. Acto seguido, las muestras se sometieron a un nuevo lavado con PBS. A continuación, se añadió la solución de colorante, que fue mantenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, la solución de "alizarin red" fue retirada y tras dos nuevos lavados con PBS, las muestras fueron visualizadas bajo el microscopio a 10 y 20 aumentos. La adquisición de fenotipo de célula ósea se reveló por la existencia de depósitos de mineral teñidos de color rojo.

### **5.2.2.- DIFERENCIACION ADIPOGENICA**

En el caso de las células sometidas a inducción adipogénica, se buscó la aparición de células que presentasen gotas de lípidos en el interior de su citoplasma. Para llevar a cabo el estudio de la existencia de dichas vesículas lipídicas, las muestras fueron teñidas utilizando una solución de "Oil Red O" (n=30).

Tras retirar el medio, los recipientes de cultivo fueron sometidos a dos lavados consecutivos con PBS y una posterior fijación de las células con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS. A continuación, se añadió propilenglicol al 100% durante 2 minutos, tiempo tras el cual esta solución fue retirada y se añadió el colorante, "Oil Red O", durante 30 minutos. Tras retirar el colorante, se procedió al lavado de las muestras con una solución de propilenglicol al 60% en agua destilada durante 1 minuto. Nuevamente, las muestras fueron sometidas a un lavado con PBS y se procedió al contrastado de los núcleos celulares mediante la incubación de las muestras con una solución de hematoxilina de Gill nº3, durante 10 minutos. Tras tres nuevos lavados con PBS, las muestras fueron visualizadas utilizando un microscopio óptico invertido y fueron recogidas imágenes a 10, 20 y 40 aumentos. Se consideraron

células con fenotipo adiposo todas aquellas que presentaban gotitas lipídicas de color rojo intenso en su citoplasma.

### **5.2.3.- DIFERENCIACION CONDROGENICA**

Para la diferenciación condrogénica se estudió la síntesis, por parte de las células, de una matriz extracelular rica en muco-sustancias de naturaleza ácida. Para ello, las muestras fueron teñidas con una solución de azul alcian al 3% en ácido acético (n=30).

Una vez retirado el medio de cultivo y tras realizar dos lavados con PBS, los cultivos fueron fijados con para-formaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, y realizando 2 lavados previos con PBS, para eliminar la solución de fijador, se añadió ácido acético al 3% durante 1 minuto. Una vez retirada esta solución, se añadió la solución de azul alcian a pH 2,5 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió al contrastado de los núcleos añadiendo una solución de "nuclear fast red". Por último, tras tres nuevos lavados con PBS para eliminar el exceso de colorante, se procedió a la visualización de las muestras, recogiendo imágenes a 10 y 20 aumentos. En este caso, las muco-sustancias ácidas, como los proteoglicanos típicos de la matriz extracelular sintetizada por las células que hayan adquirido fenotipo de condrocito, aparecerán teñidos de azul, mientras que los núcleos celulares y el citoplasma mostrarán un tono rojo-rosáceo.

## **6.- ANALISIS DE LOS SUSTITUTIVOS (GFF Y GFCL)**

### **6.1.- ESTUDIOS HISTOLOGICOS**

Con el fin de poder analizar mediante microscopia óptica las características de los GFF y GFCL construidos, se llevaron a cabo técnicas de histología básicas.

Se recogieron GFF a los días de cultivo 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 21 (n= 20 por cada tiempo) y GFCL a día 14 y día 21 (n=20). Las muestras fueron recuperadas de los

recipientes de cultivo utilizando unas pinzas estériles. Posteriormente, fueron sometidas a varios lavados con PBS, con el fin de retirar los restos de medio de cultivo. A continuación, se procedió a su fijación, utilizando una solución de para-formaldehído al 10% en PBS, en la que permanecieron durante un mínimo de 24 horas antes de continuar con su procesamiento para la realización del estudio histológico.

Una vez fijadas, las muestras fueron recuperadas e introducidas en "cassettes" de histología. Tras un lavado con agua destilada, se procedió a su procesamiento utilizando un procesador de tejidos para histología (Shandon-Excelsior<sup>TM</sup>, Thermo Scientific), en el que fueron deshidratadas en una serie de concentraciones crecientes de alcohol y xileno (alcohol de 70°, alcohol de 90°, alcohol de 96°, alcohol absoluto, xileno), para su posterior inclusión en bloques de parafina. Una vez sustituida el agua de las muestras por xileno, se procedió al tratamiento de las muestras con tres baños de parafina, para permitir una mayor impregnación de la parafina en el interior de los "tejidos".

A continuación, las muestras fueron recuperadas del procesador e introducidas en un baño de parafina, donde fueron mantenidas hasta el momento de su inclusión. Para realizar el montaje de las muestras en los bloques de parafina, éstas fueron recuperadas de los "cassettes" e incluidas utilizando moldes de inclusión previamente rellenados con parafina líquida. Todo esto se llevó a cabo utilizando un inclusor de muestras (Leica EG1150M, Leica Microsystems). Antes de la solidificación de los bloques que contenían las muestras en su interior, la base del "cassette" fue colocada sobre la parafina, para mantener así la identificación de los bloques.

Acto seguido, y tras realizar un enfriamiento de los bloques de parafina sobre una placa refrigerada (Microm CP60, Mikron Instruments, Inc.), las muestras fueron montadas en un microtomo de rotación monitorizado (Leica RM2255, Leica Microsystems) y se realizaron secciones de 6 µm de grosor.

Los cortes obtenidos, fueron depositados en un baño termostático de flotación (Termofin, Selecta) para el estiramiento de los mismos y recuperados con un portaobjetos debidamente rotulado para la identificación de la muestra.

A partir de cada una de las muestras procesadas se prepararon, como mínimo, tres portas con secciones seriadas. Dichas secciones fueron teñidas siguiendo un protocolo de tinción estándar con hematoxilina y eosina, azul alcian o elástica de van Gieson. El estudio de las secciones teñidas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico directo de campo claro, acoplado a un sistema de recogida de imágenes. Se recogieron imágenes a 10x, 20x y 40x.

Para poder establecer comparaciones de los GFCL con el tejido nativo, a su vez, y siguiendo la metodología descrita anteriormente se obtuvieron secciones de la región limbar y la córnea, obtenidas a partir de globos oculares porcinos, que fueron teñidos de la misma manera.

### **6.1.1.- PROTOCOLOS DE TINCION**

Para la coloración de las secciones obtenidas, en primer lugar, éstas fueron sometidas a un proceso de desparafinización consistente en dos baños consecutivos en xilol, durante 10 minutos. A continuación, las secciones fueron re-hidratadas mediante su incubación en contacto con soluciones de alcoholes de gradación decreciente (alcohol absoluto, alcohol de 96°, alcohol de 90°, alcohol de 70°), durante 2 minutos cada una. Finalmente, las muestras se lavaron en agua destilada durante otros 2 minutos y se procedió a la realización de la tinción.

**Hematoxilina/eosina:** Primeramente, las muestras fueron sumergidas en hematoxilina de Mayer durante 2 minutos (colorante básico que va a dar coloración a los núcleos celulares y resto de estructuras ácidas de las preparaciones). Tras ese tiempo, se procedió a la inmersión de los portas en una solución de alcohol de 50°, con el fin de eliminar de manera selectiva un posible exceso de tinción por parte del primer colorante. Acto seguido, las muestras se introdujeron en un coplin en contacto con una solución de eosina (colorante ácido responsable de colorear las estructuras básicas de las muestras), durante 4 minutos.

**Azul Alcian:** Las secciones, una vez desparafinadas y re-hidratadas, fueron tratadas durante 3 minutos con una solución de ácido acético al 3%. Seguidamente, fueron sumergidas en una solución de azul alcian a pH 2,5, durante 30 minutos. A continuación, y tras realizar dos lavados de las secciones con agua corriente y agua destilada, de 2 minutos de duración cada uno, las muestras fueron contrastadas utilizando "nuclear fast red" durante 5 minutos. Por último, las secciones fueron lavadas con agua corriente durante 1 minuto. Con esta tinción los núcleos celulares aparecen de color rosa a rojo, los citoplasmas de un color rosa pálido y las mucosustancias (proteoglicanos) aparecen teñidas de color azul.

**Tinción Elástica de van Gieson:** Las secciones fueron primeramente sumergidas en una solución de tinción elástica, compuesta por hematoxilina alcohólica, cloruro férrico, yodo de Weigert y agua destilada, durante 10 minutos. Tras este tiempo las muestras fueron lavadas con agua destilada y a continuación se procedió a la diferenciación de las secciones con una solución de cloruro férrico. Tras un lavado con agua corriente, las muestras fueron sumergidas en alcohol del 95% para eliminar el exceso de yodo y se procedió a un nuevo lavado de las mismas con agua destilada. Seguidamente, las muestras fueron teñidas con solución de van Gieson durante 1 a 3 minutos. Tras esta tinción las fibras elásticas y los núcleos de las células aparecen teñidos de negro azulado a negro, el colágeno de color rojo y otras estructuras de color amarillo.

Tras la incubación en contacto con las soluciones colorantes, las muestras fueron sometidas, de nuevo, a un proceso de deshidratación, necesario para su montaje. Dicha deshidratación consistió en la inmersión de los portales en soluciones de alcohol de 96° (x2), alcohol absoluto (x2) y dos baños consecutivos de xileno durante 1 minuto cada uno. Finalmente, se procedió al montaje de las muestras añadiendo sobre las mismas una gota de medio de montaje, y cubriéndolas en seguida con un cubreobjetos de vidrio, aplicando una ligera presión para eliminar las posibles burbujas de aire que pudieran interferir con la posterior visualización de las preparaciones.

## **6.2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)**

Con el fin de obtener más información sobre las características estructurales tanto de los GFF como de los GFCL, se realizaron estudios de MEB, sobre ambos sustitutivos.

Se recogieron muestras de GFF y GFCL, a los 14 y 21 días de cultivo in vitro (n=5, respectivamente). Las muestras recuperadas de las superficies de cultivo, tras un lavado previo con PBS, fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2,5%, durante 48 horas, en oscuridad y a 4°C. A continuación, se llevó a cabo una post-fijación con tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas. Seguidamente y para eliminar así los restos de las sustancias empleadas como fijadores, las muestras fueron sometidas a tres lavados consecutivos en PBS durante 30 minutos cada uno, para, seguidamente, deshidratarlas lentamente, mediante baños, de 1 hora de duración cada uno, utilizando soluciones de alcoholes de gradación creciente.

Tras una incubación de 12 horas en alcohol absoluto, las muestras fueron introducidas en un desecador de punto crítico (CPD Balzers), y se llevó a cabo la sustitución del agente intermedio, alcohol absoluto, por CO<sub>2</sub>, consiguiendo así una desecación completa de las muestras. Durante este proceso, se realizaron 9 lavados, permitiendo la entrada a la cámara del desecador de nuevo CO<sub>2</sub> cada 20 minutos, con el fin de asegurar la total sustitución del alcohol.

Una vez desecadas las muestras, debido a su carácter higroscópico, fueron mantenidas en la cámara del desecador, hasta que fueron recubiertas. Para ello, en primer lugar, y utilizando unas pinzas finas, las muestras fueron montadas mediante adhesión sobre portamuestras de aluminio previamente recubiertos con cinta adhesiva de doble cara. Acto seguido, las muestras fueron introducidas en un recubridor (Sputter coater SCD 004, Balzers), para realizar el recubrimiento de las mismas con una capa de oro coloidal para asegurar la conductividad eléctrica de toda su superficie. En dicho aparato, una vez producido el vacío, tras varios lavados con gas argón, mediante la aplicación de una corriente de 0.35 mV durante 400 segundos, se produce la ionización del argón que permite la pulverización del oro sobre la muestra.

La visualización de las muestras, se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL 6100).

### **6.3.- CRECIMIENTO CELULAR**

Con el fin de estudiar el comportamiento de la población de células de naturaleza estromal en el interior de los andamiajes de fibrina, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular.

Dichos ensayos se realizaron mediante la determinación del número de células presentes en los GFF en los días de cultivo 3, 5, 7, 10, 12 y 14 (n= 20, por cada tiempo).

En primer lugar, se procedió a retirar el medio de cultivo en contacto con los GFF antes de recuperarlos de los recipientes de cultivo con ayuda de unas pinzas y depositarlos en una placa de Petri. A continuación, utilizando un bisturí, se realizó una digestión mecánica de los GFF y acto seguido, los pedazos fueron colocados en tubos de polipropileno estériles en contacto con una solución de colagenasa tipo I a una concentración de 1 mg/ml. Las muestras en contacto con la solución enzimática fueron incubadas a 37°C durante 3 horas. Tras ese período la mezcla se sometió a un pipeteo vigoroso, para facilitar la individualización celular.

Las suspensiones celulares obtenidas fueron centrifugadas y los pellets aislados de dicho proceso fueron utilizados para la cuantificación celular.

Los resultados obtenidos fueron representados como número de células en función del tiempo de cultivo, lo que permitió establecer una tasa de multiplicación de la población celular a lo largo del período de cultivo establecido.

En el caso de la población de células epiteliales sembradas sobre los GFF para la elaboración de los GFCL, el análisis del crecimiento celular únicamente se realizó de manera cualitativa, mediante observación diaria de la evolución de los cultivos.

#### **6.4.- PROPIEDADES MECANICAS**

Para determinar la posible contracción de los GFF, su grosor a tiempo 0 y 14 días fue cuantificado antes y después de su recuperación de los recipientes de cultivo. Además, la contracción del gel fue estudiada siguiendo un método ya publicado<sup>204</sup>. Brevemente, estos GFFs fueron deshidratados en etanol absoluto durante 30 minutos. Posteriormente, los geles fueron lavados 3 veces en PBS durante 30 minutos y sumergidos en MCF fresco durante otros 30 minutos para que se equilibrasen con el medio. El diámetro y grosor de los geles antes y después de la re-hidratación fue cuantificado para determinar la posible contracción de los geles mediada por las células.

#### **7.- ANALISIS ESTADISTICO**

Para comparar estadísticamente la eficacia de ambos protocolos de digestión, en términos de número de células epiteliales y estromales recuperadas y valores de tasa de expansión, se utilizó la prueba t de Student de dos colas de distribución y variables independientes, tras comprobar que las muestras se ajustaban a una distribución normal. Un valor de p menor o igual a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para determinar las diferencias en la proporción de cultivos primarios exitosos obtenidos entre los diferentes procedimientos de digestión, así como para comparar la viabilidad de las células obtenidas mediante cada uno de los dos procedimientos de digestión, se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

## **IV.- RESULTADOS**

## IV.- RESULTADOS

### 1.- TECNICAS DE DIGESTION

Del total de las 150 muestras de tejido limbar sometidas a los procesos de digestión Pest y Pinv (n = 75, respectivamente), se consiguieron obtener suspensiones de células aisladas viables en el 100% de los casos.

En cuanto a rendimiento total, entendiendo como tal el número total de células aisladas de cada muestra de tejido limbar al final de todo el proceso de digestión (pasos de incubación con colagenasa y T/E), ambos protocolos de digestión generaron un rendimiento celular de  $68.875 \pm 34.409$  células/biopsia (n=75) para el Pest y  $68.946 \pm 47.078$  células/biopsia (n=75) para el Pinv, no existiendo diferencias significativas en cuanto a rendimiento celular total en función del protocolo de digestión utilizado ( $p=0,99$ ) (Figura 17). Además, la viabilidad de las suspensiones celulares obtenidas fue similar para ambos protocolos ( $p=0,39$ ) (Tabla 4).

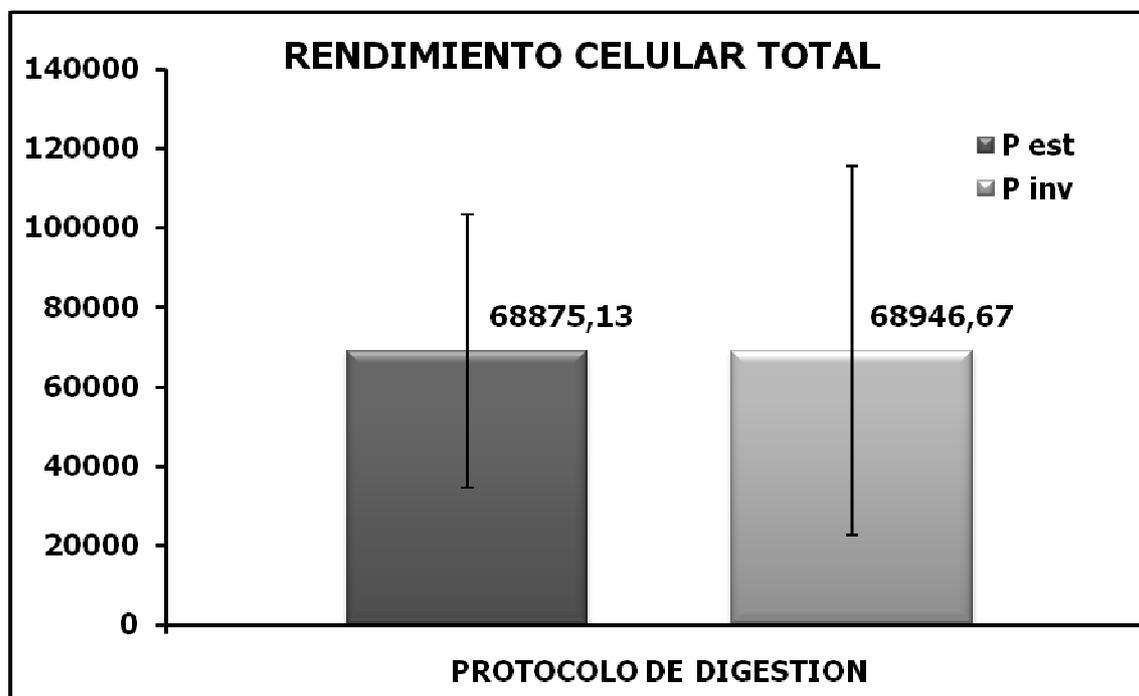


Figura 17: Rendimiento celular total. El número de células totales (media  $\pm$  desviación estándar) obtenido al final de los protocolos de digestión estándar (Pest) e invertido (Pinv) fue similar ( $p=0,99$ )

Sin embargo, al analizar de manera independiente los rendimientos parciales de cada uno de los protocolos obtenidos tras los diferentes pasos de digestión, incubación con colagenasa y digestión mediante tripsinización del tejido, aparecían claras diferencias entre ambos protocolos (Figura 18).

En el caso del Pest, el número de células aisladas tras la actuación de la colagenasa fue de  $54.728 \pm 33.701$  células/biopsia ( $n=75$ ), siendo significativamente mayor ( $p<0,05$ ) que las  $14.146 \pm 11.592$  células/biopsia ( $n=75$ ) obtenidas tras la incubación con tripsina inicial (Figura 18A). Por el contrario, con el Pinv, el mayor número de células totales aisladas a partir del tejido limbar se obtuvo tras el paso de tripsinización (Figura 18B), con un rendimiento de  $56.050 \pm 43.138$  células/biopsia ( $n=75$ ) mientras que el número de células aisladas tras la incubación previa con colagenasa fue menor,  $12.896 \pm 10.675$  células/biopsia ( $n=75$ ) ( $p<0,05$ ).

En cuanto a rendimientos de viabilidad parciales, no se obtuvieron diferencias en la viabilidad de las células aisladas tras la incubación con colagenasa, indistintamente del protocolo empleado ( $p=0,55$ ). Sin embargo, tras el paso de tripsinización de las muestras de tejido limbar, en el caso del Pest la viabilidad de las células aisladas fue menor que la viabilidad obtenida tras el mismo paso de digestión utilizando el Pinv ( $p<0,05$ ) (Tabla 4).

		<b>Pest</b>	<b>Pinv</b>	<b>Significancia</b>
<b>RENDIMIENTO PARCIAL</b>	<b>Colagenasa</b>	$97,93 \pm 3,30$	$98,28 \pm 3,75$	$p=0,55$
	<b>Tripsina/EDTA</b>	$93,14 \pm 11,78$	$97,39 \pm 4,92$	$p<0,05$
<b>RENDIMIENTO TOTAL</b>	<b>Colagenasa + Tripsina/EDTA</b>	$96,90 \pm 3,22$	$97,93 \pm 3,30$	$p=0,40$

Tabla 4: Rendimientos de viabilidad celular (media  $\pm$  desviación estándar) parciales y totales obtenidos a partir de los protocolos de digestión estándar (Pest) e invertido (Pinv).

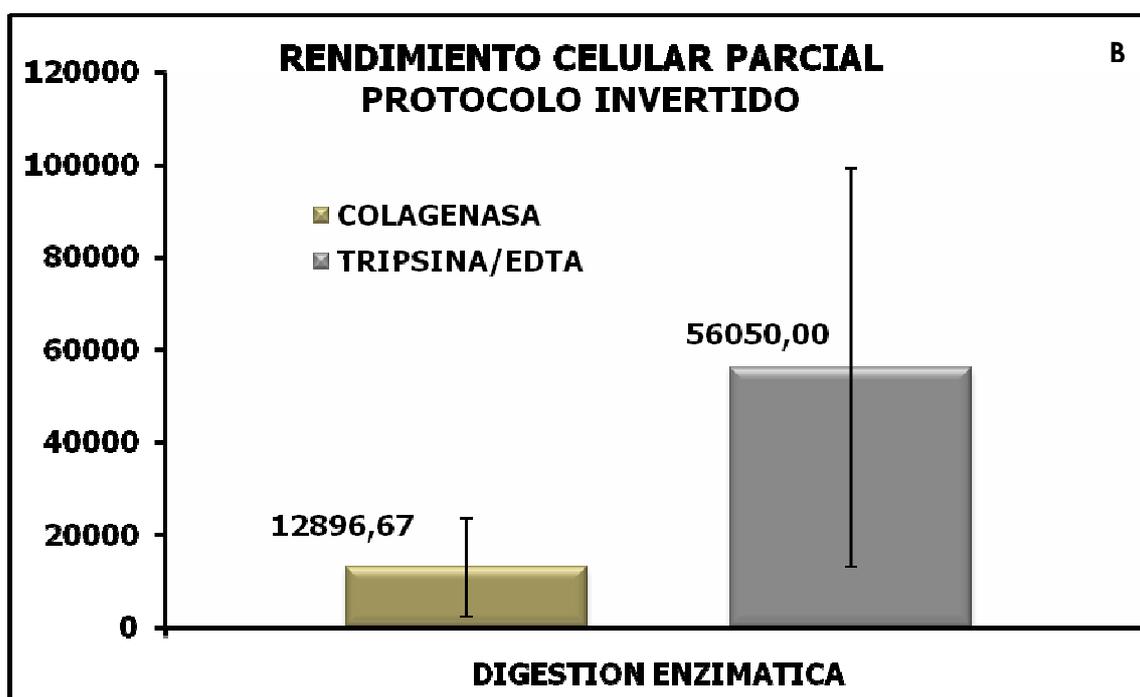
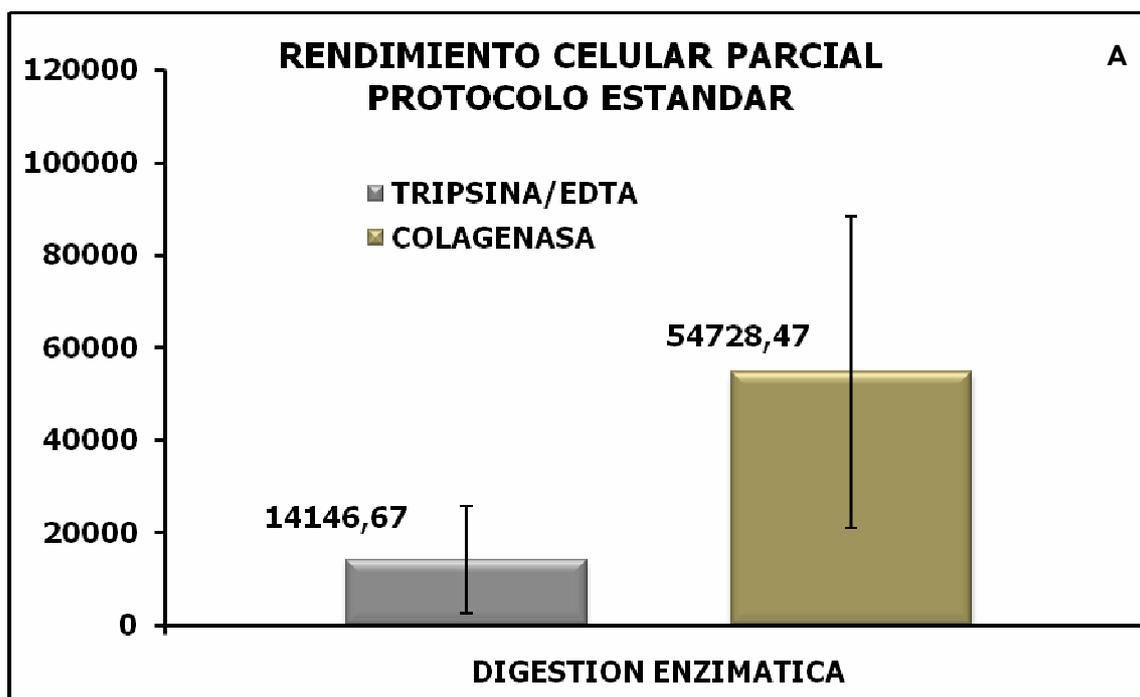


Figura 18 : Rendimiento celular parcial. El número de células (media  $\pm$  desviación estándar) aisladas a partir de los pasos de digestión con colagenasa y tripsina/EDTA (T/E) fue diferente en función del protocolo de digestión utilizado ( $p < 0,05$ ). (A) En el protocolo estándar la incubación con T/E llevó a la obtención de un mayor número de células aisladas que el paso posterior de incubación con la colagenasa ( $p < 0,05$ ). (B) En el protocolo invertido la digestión inicial de las muestras de tejido limbar con colagenasa resultó en un menor número de células aisladas que la digestión con T/E ( $p < 0,05$ ).

## 2.- CULTIVO CELULAR

El porcentaje de P0 exitosos que consiguieron establecerse a partir de las suspensiones celulares obtenidas mediante los protocolos de digestión, Pest y Pinv, aparece detallado en la Tabla 5.

		Pest	Pinv	Significancia
<b>PORCENTAJE DE P0 EXITOSOS</b>	<b>Colagenasa</b>	96% (72/75)	100% (75/75)	p=0,69
	<b>Tripsina/EDTA</b>	57,33% (43/75)	93,33% (70/75)	p<0,05

Tabla 5: Porcentaje de cultivos primarios (P0) exitosos establecidos a partir de las suspensiones celulares obtenidas mediante los protocolos de digestión estándar (Pest) e invertido (Pinv).

De las 75 biopsias digeridas siguiendo el Pest, tan solo 43 (57,33%) dieron lugar a P0 exitosos para las poblaciones de células epiteliales y estromales. Esta tasa aumentó considerablemente ( $p<0,05$ ) cuando se cultivaron las suspensiones celulares aisladas mediante el Pinv, ya que 70 de las 75 muestras de tejido limbar digeridas (93,33%) dieron lugar a P0 exitosos para ambos tipos celulares.

Las células obtenidas tras la incubación de las muestras tisulares con solución de colagenasa (y por tanto de aparente naturaleza estromal) dieron lugar en el caso del Pest a un 96% de P0 exitosos y un 100% en el caso del Pinv ( $p=0,69$ ). A las pocas horas de su siembra, éstas células adoptaron una morfología entre espicular y estrellada, típica de células de naturaleza fibroblástica (Figura 19). Durante la progresión del cultivo, la población celular fue conformando una red de células interconectadas a través de sus procesos citoplasmáticos, alcanzando el estado de confluencia tras 6-10 días. La TEx alcanzada por estas células al final del P0 fue de  $7,36 \pm 2,64$  ( $n=72$ ) en el caso de las células aisladas mediante el Pest y de  $6,97 \pm 2,08$  ( $n=75$ ) en el caso de las células aisladas mediante el Pinv, obteniéndose una densidad celular final de aproximadamente  $69.656 \pm 20.798$  células/cm<sup>2</sup> ( $n=72$ ) y  $73.634 \pm 26.446$  células/cm<sup>2</sup> ( $n=75$ ) para el Pest y el Pinv respectivamente ( $p=0,31$ ) (Figura 20).

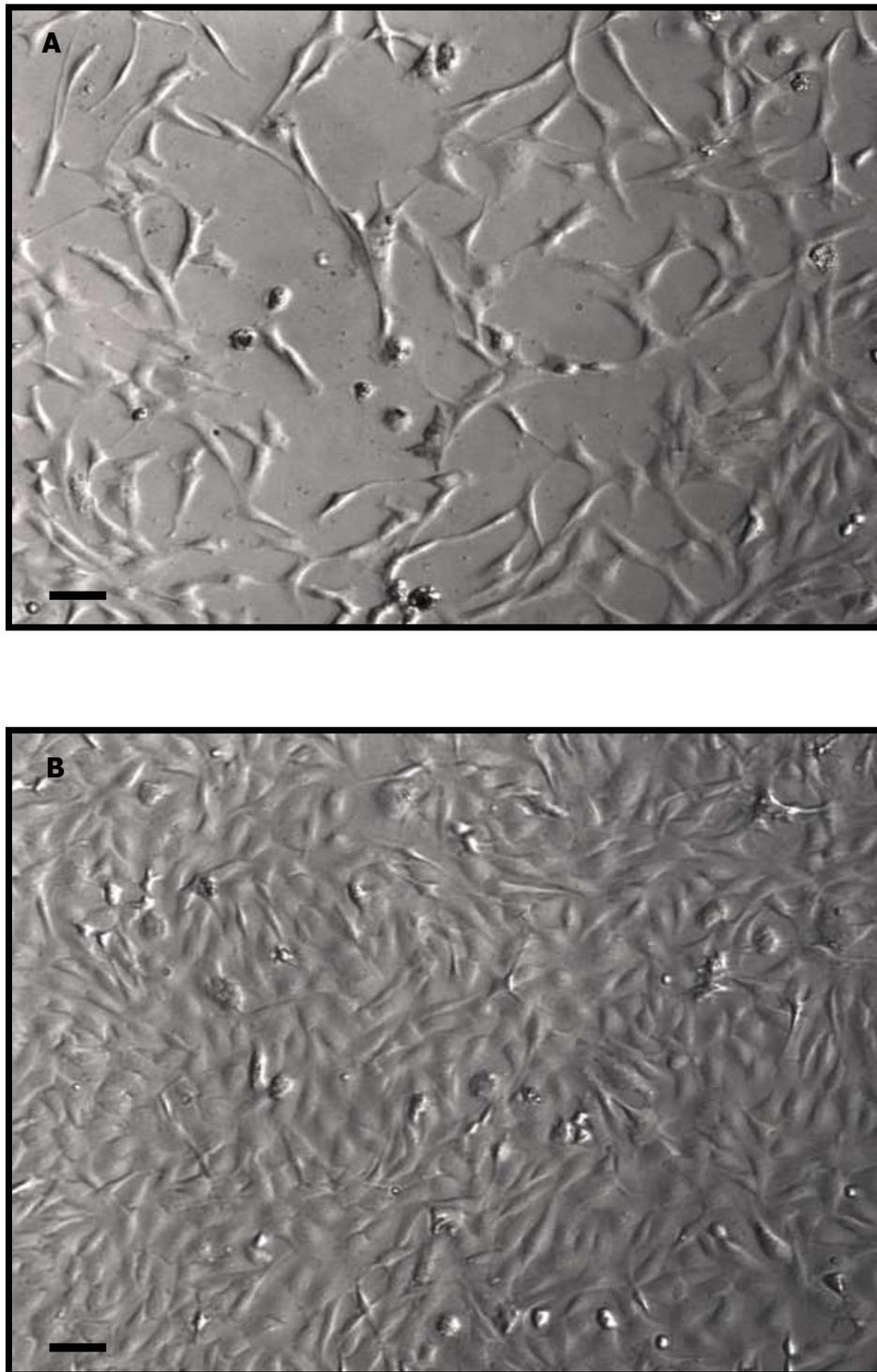


Figura 19: Morfología de las células de naturaleza aparentemente estromal durante el P0 a los 4 días de cultivo (A) y en estado de confluencia (B). Magnificación 10x. Barra: 100µm

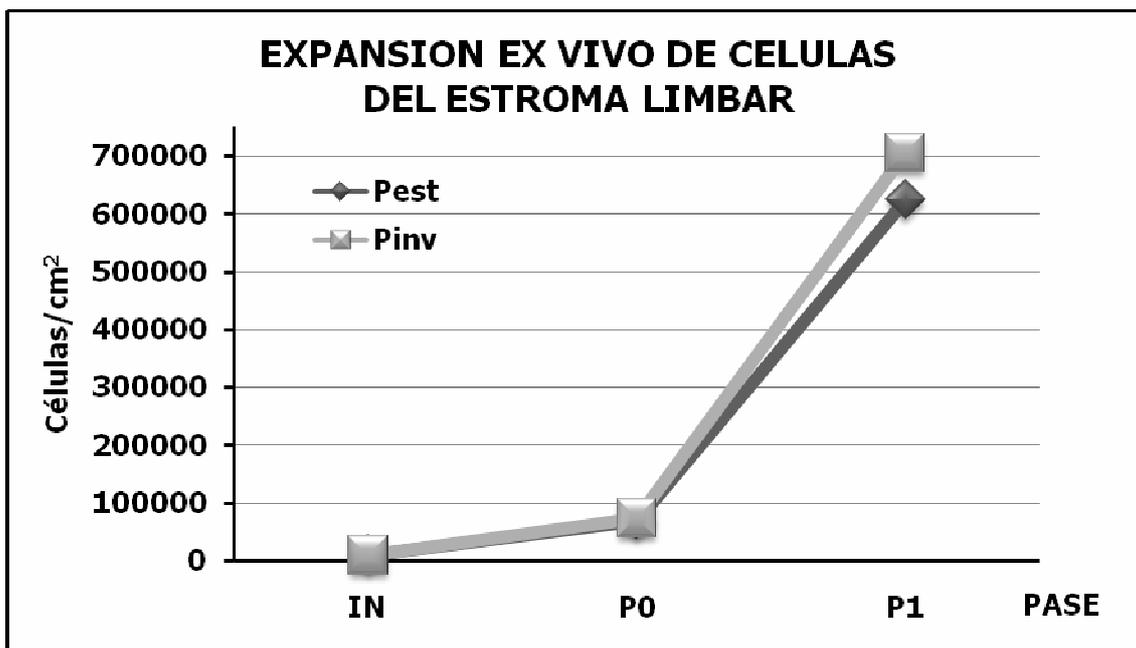


Figura 20: Proliferación de las poblaciones de células estromales durante la expansión ex vivo en cultivo primario (P0) y un primer pase (P1). Pest = protocolo estándar; Pinv = protocolo invertido; IN = densidad de siembra inicial.

Tras la realización del subcultivo de las poblaciones de células estromales (P1), las células sembradas mostraban una morfología típicamente fibroblástica y la TEx obtenida al finalizar dicho P1 fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que en el P0 con valores de  $89.617 \pm 24.716$  células/cm<sup>2</sup> ( $n=72$ ) y  $95.798 \pm 32.698$  células/cm<sup>2</sup> ( $n=75$ ) para el Pest y el Pinv respectivamente, no existiendo diferencias significativas en cuanto a tasas de expansión celular entre las células obtenidas mediante ambos protocolos de digestión ( $p=0,19$ ) (Figura 19). Las células del P1 alcanzaron el estado de confluencia a los 3-5 días posteriores a la siembra, disminuyéndose de manera considerable el tiempo necesario para que las células subcultivadas alcanzaron la confluencia en comparación con las células cultivadas en los P0.

Las células aisladas mediante el tratamiento con T/E de las muestras limbares (y por tanto de presumible naturaleza epitelial) mostraron unos rendimientos del 57,33% y el 93,33% en cuanto al establecimiento de P0 exitosos para el Pest y el Pinv respectivamente ( $p < 0,05$ ). Dentro de las primeras 24 horas del P0 se comenzaron a apreciar células adheridas a las superficies de cultivo y pasados 2 días a partir de la siembra, ya se podían observar pequeñas colonias de células de morfología típicamente epitelial, poligonales y en adoquinado (Figura 21).



Figura 21: Morfología de las células de naturaleza aparentemente epitelial al término del cultivo primario (P0). (A) Magnificación 10x. Barra: 100 $\mu$ m. (B) Ampliación.

El tiempo que estos P0 necesitaron para alcanzar el estado de confluencia fue de entre 10 y 16 días. La TEx fue de  $6,27 \pm 1,58$  (n=43) en el caso del Pest y  $5,91 \pm 1,60$  (n=70) en el caso del Pinv ( $p=0,25$ ). Al final de los P0 dichas poblaciones celulares alcanzaron una densidad celular de aproximadamente 60.000 células/cm<sup>2</sup> (Figura 22).

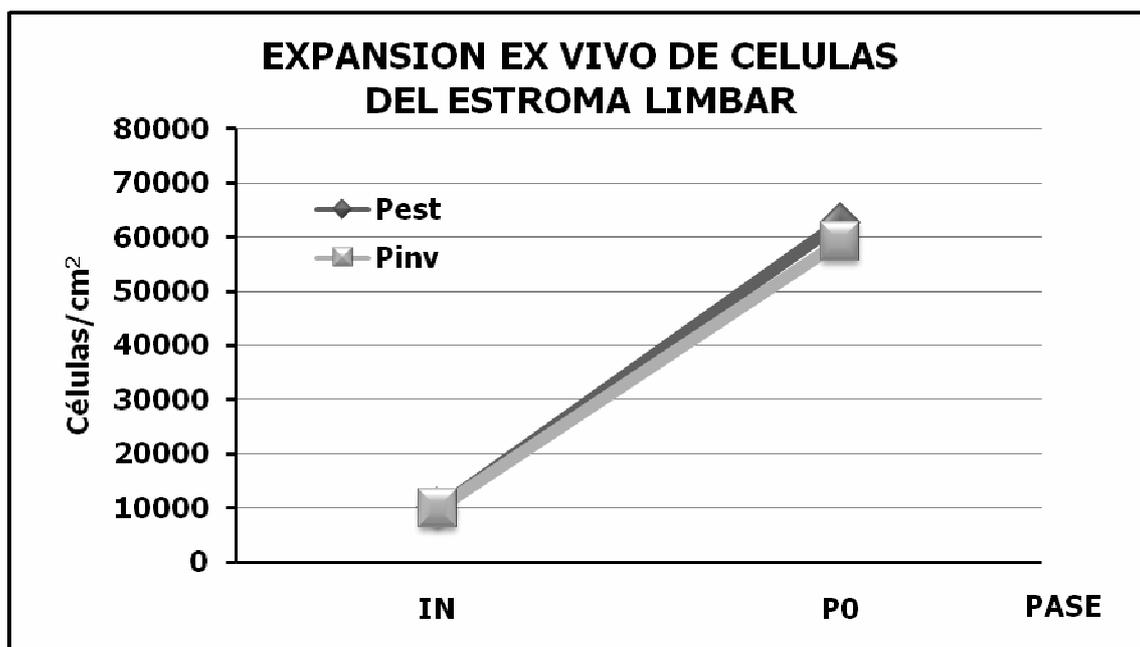


Figura 22: Proliferación de las poblaciones de células epiteliales durante la expansión ex vivo en cultivo primario (P0). (Pest: protocolo estándar, Pinv: protocolo invertido, IN: densidad de siembra inicial).

En resumen, el protocolo de digestión Pinv, resultó superior en términos de establecimiento de los P0 exitosos, por lo que los siguientes estudios (elaboración de los GFF y GFCL) fueron llevados a cabo con las suspensiones celulares obtenidas utilizando este protocolo de digestión.

### 3.- ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para asegurar la naturaleza epitelial o estromal de las poblaciones celulares expandidas ex vivo se llevaron a cabo estudios de expresión de antígenos específicos, mediante técnicas de inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos, tanto para las secciones de

tejido limbar porcino control, como para las células cultivadas, aparecen resumidos en la Tabla 6. Todos los controles negativos realizados fueron siempre negativos.

	Región Limbar		Córnea		Conjuntiva		Células Estromales		Células Epiteliales
	Ep	Es	Ep	Es	Ep	Es	P0	P1	P0
<b>ALDH1A1</b>	++	(+)	++	++	++	+	++	++	++
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Colágeno tipo II</b>	(+)	++	+	++	+	++	(+)	++	+
<b>Conexina43</b>	+	++	++	++	++	++	++	+	++
<b>Desmoplaquina</b>	++	(+)	++	(+)	++	+	+	++	++
<b>Integrina <math>\beta</math>1</b>	++	+	++	+	++	+	(+)	+	++
<b>Pancitoqueratina</b>	++	-	++	-	++	-	-	-	++

Tabla 6: Resultados de los estudios de inmunofluorescencia realizados sobre el tejido limbar de origen porcino y las células de naturaleza estromal en cultivo primario (P0) y primer pase (P1) y epitelial en P0. Los grados de intensidad de fluorescencia fueron definidos como: -, no fluorescencia, (+), intensidad de fluorescencia leve, +, intensidad de fluorescencia moderada y ++, intensidad de fluorescencia fuerte. (Ep: Epitelio, Es: estroma).

### 3.1.- TEJIDO LIMBAR, CORNEAL Y CONJUNTIVAL

Con el objetivo de determinar la reactividad de los anticuerpos utilizados para el estudio de expresión de los marcadores sobre las células de origen porcino, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia con dichos anticuerpos (su especificidad se describe en la Tabla 3) sobre cortes de tejido porcino de la región limbar congelados.

A nivel epitelial, el tejido limbar mostró reactividad frente a todos y cada uno de los anticuerpos utilizados de manera genérica en los tres tipos de epitelios que constituyen la superficie ocular (corneal, limbar y conjuntival), aunque exhibiendo diferentes patrones de fluorescencia en función del anticuerpo utilizado.

Para la ALDH1A1 se observó una fuerte expresión en toda la región epitelial de la superficie ocular (Figura 23). Dicha expresión mostraba un patrón homogéneo, apareciendo más intensidad de fluorescencia en las capas más superficiales e intermedias del epitelio y siendo algo más suave en las células que conforman la región más basal de los epitelios limbar y conjuntival. A nivel de la sustancia propia o estroma el marcaje apareció más intenso en córnea y conjuntiva, mientras que en el estroma limbar la intensidad observada era moderada.

La  $\alpha$ -SMA se expresó de manera intensa desde el epitelio corneal hasta el conjuntival, incluyendo el limbar, en todas las capas (Figura 24). Únicamente existió una disminución de la intensidad de fluorescencia en la capa más superficial del epitelio corneal. En las regiones estromales de la córnea, la conjuntiva y el limbo, se apreció una fuerte intensidad.

Para el colágeno de tipo II, los tres epitelios que constituyen la superficie ocular mostraron una intensidad moderada, con un patrón homogéneo a lo largo de todo el espesor epitelial (Figura 25). A nivel estromal fue evidente una fuerte intensidad en córnea, limbo y conjuntiva, que apareció aún más intensa en la zona de contacto con la capa epitelial, es decir, en la membrana basal.

La Cx43 presentó un patrón de expresión diferente en función de la región epitelial de la superficie corneal observada (Figura 26). El epitelio corneal apareció intensamente marcado en las capas de células basales y suprabasales, mostrando una ligera fluorescencia en la capa más superficial de células aladas, estando ausente en las capas medias. En el epitelio limbar la expresión de este marcador pareció exclusiva de las células más basales; en cambio, en el epitelio conjuntival, el patrón de mayor intensidad apareció en la parte más superficial. En el estroma conjuntival se observó un intensidad leve, mientras que en córnea, limbo y región escleral la intensidad era fuerte.

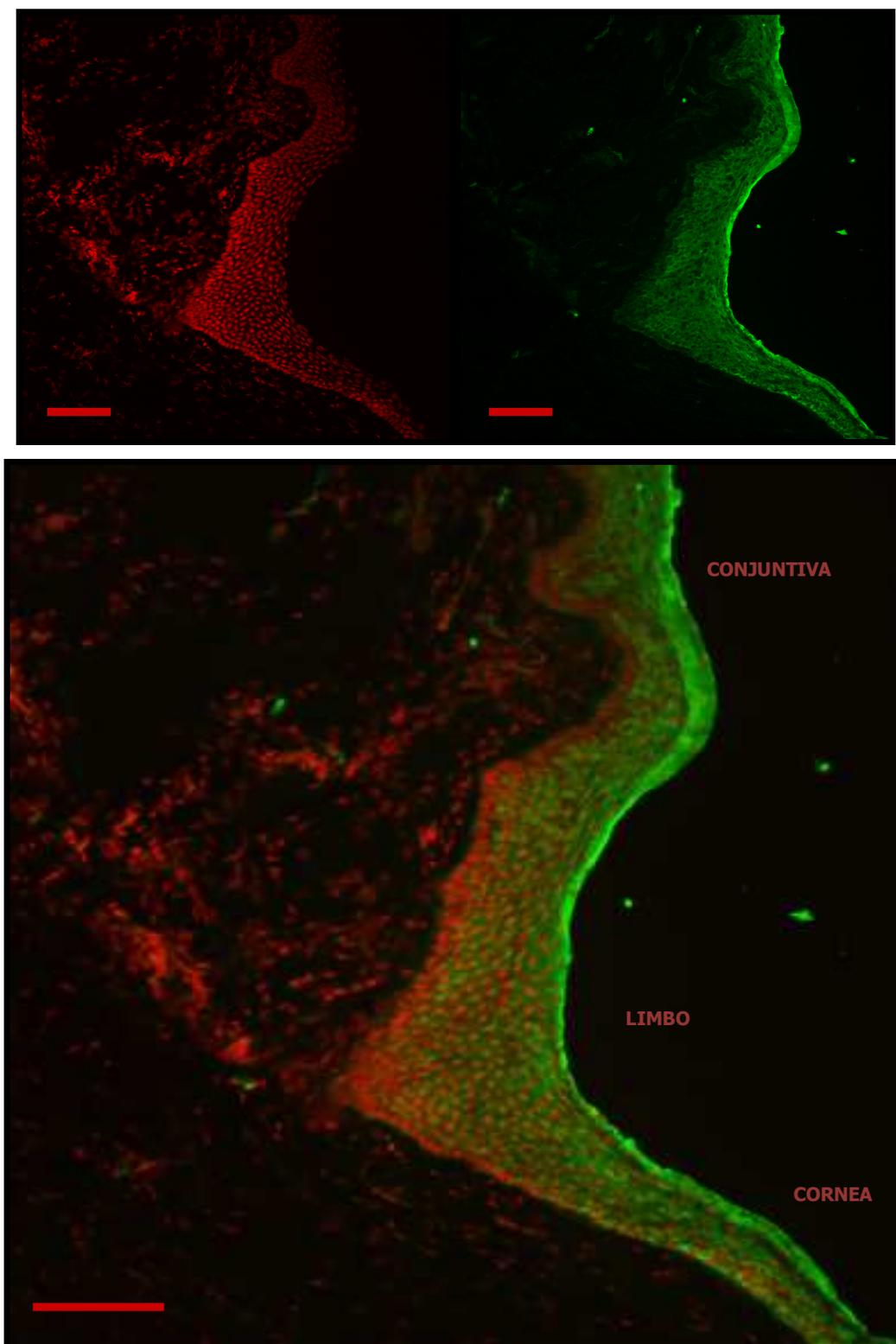


Figura 23: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con ioduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

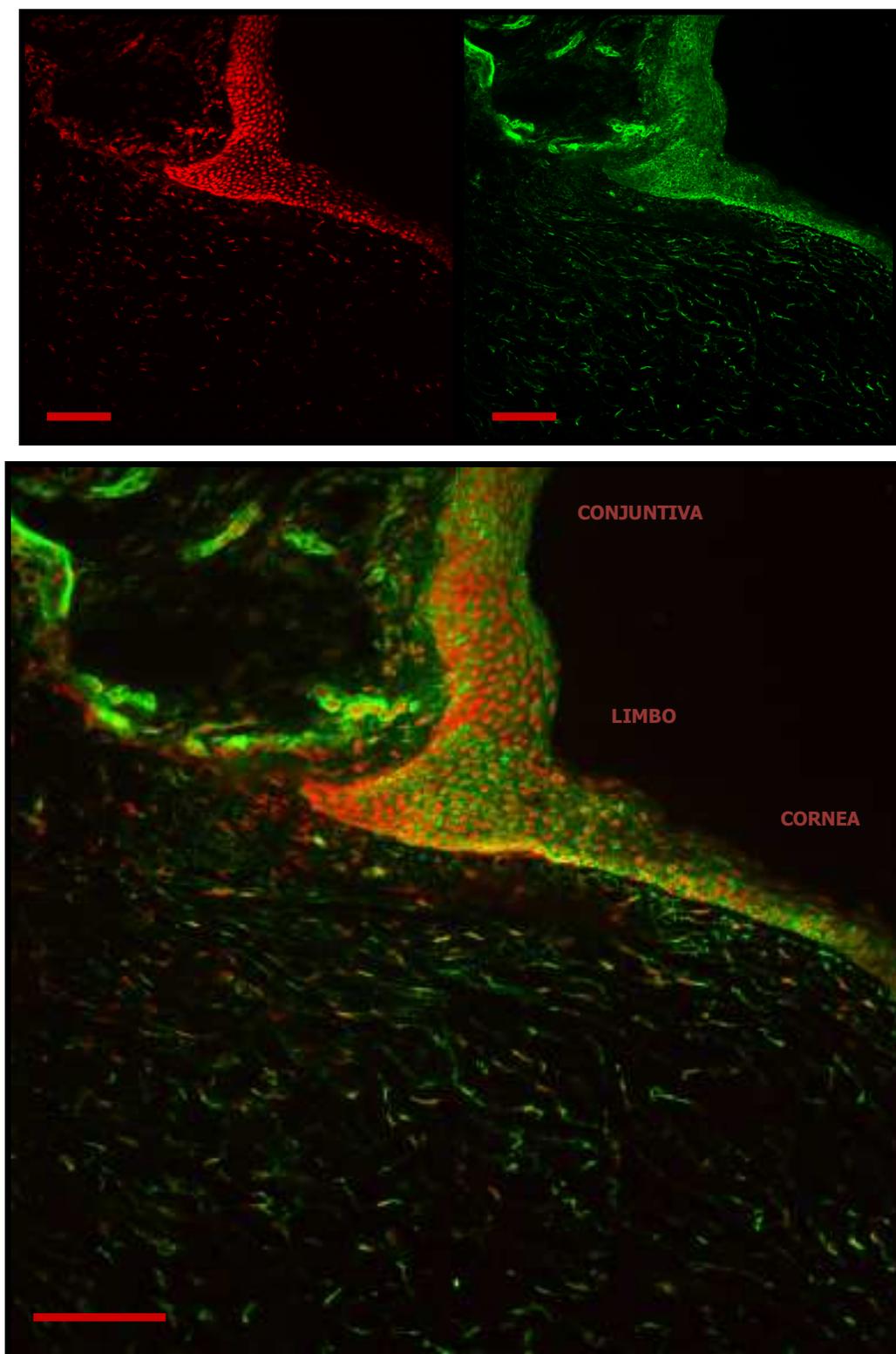


Figura 24: Expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

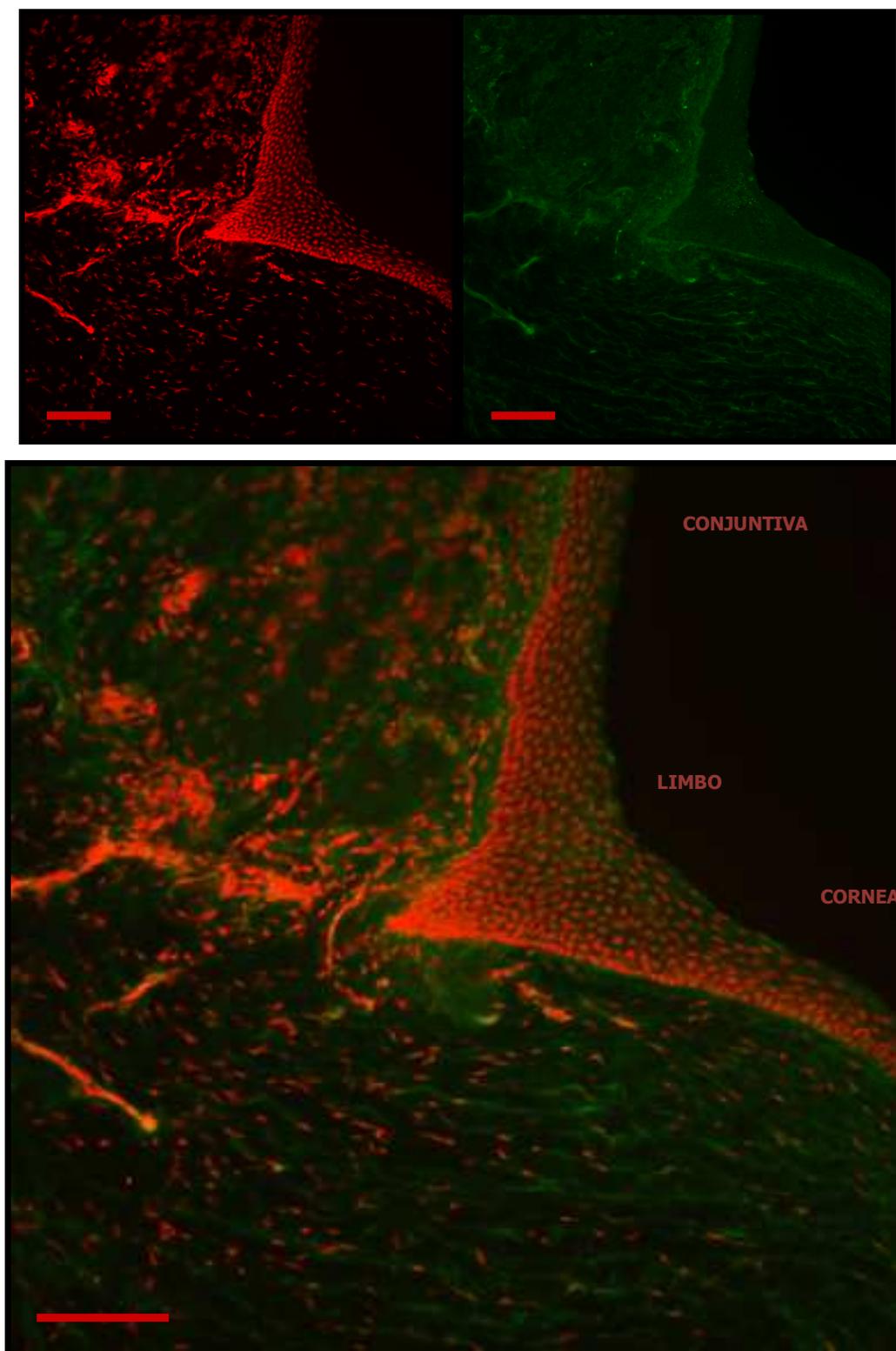


Figura 25: Expresión de colágeno de tipo II en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

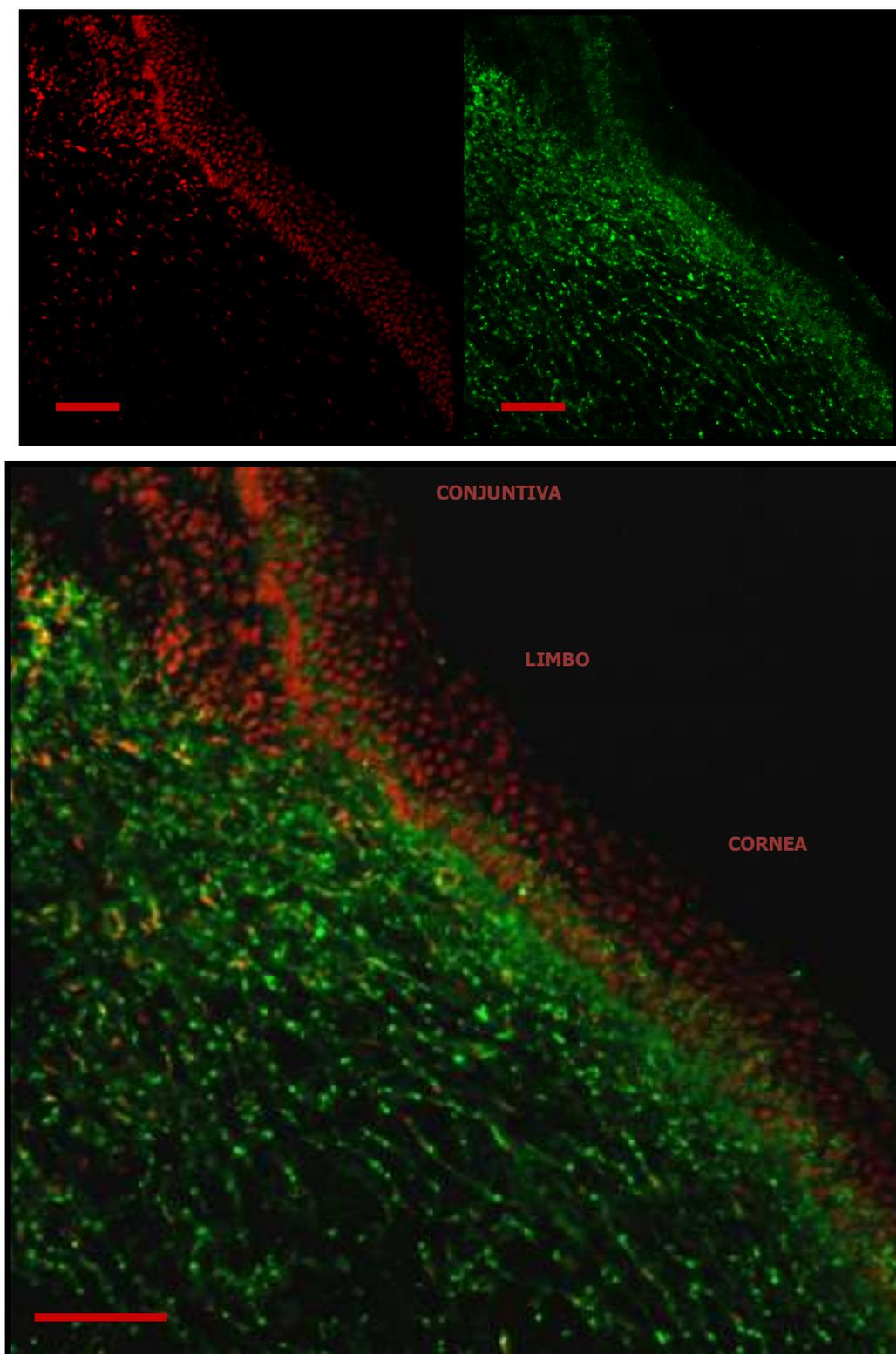


Figura 26: Expresión de connexina 43 (Cx43) en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

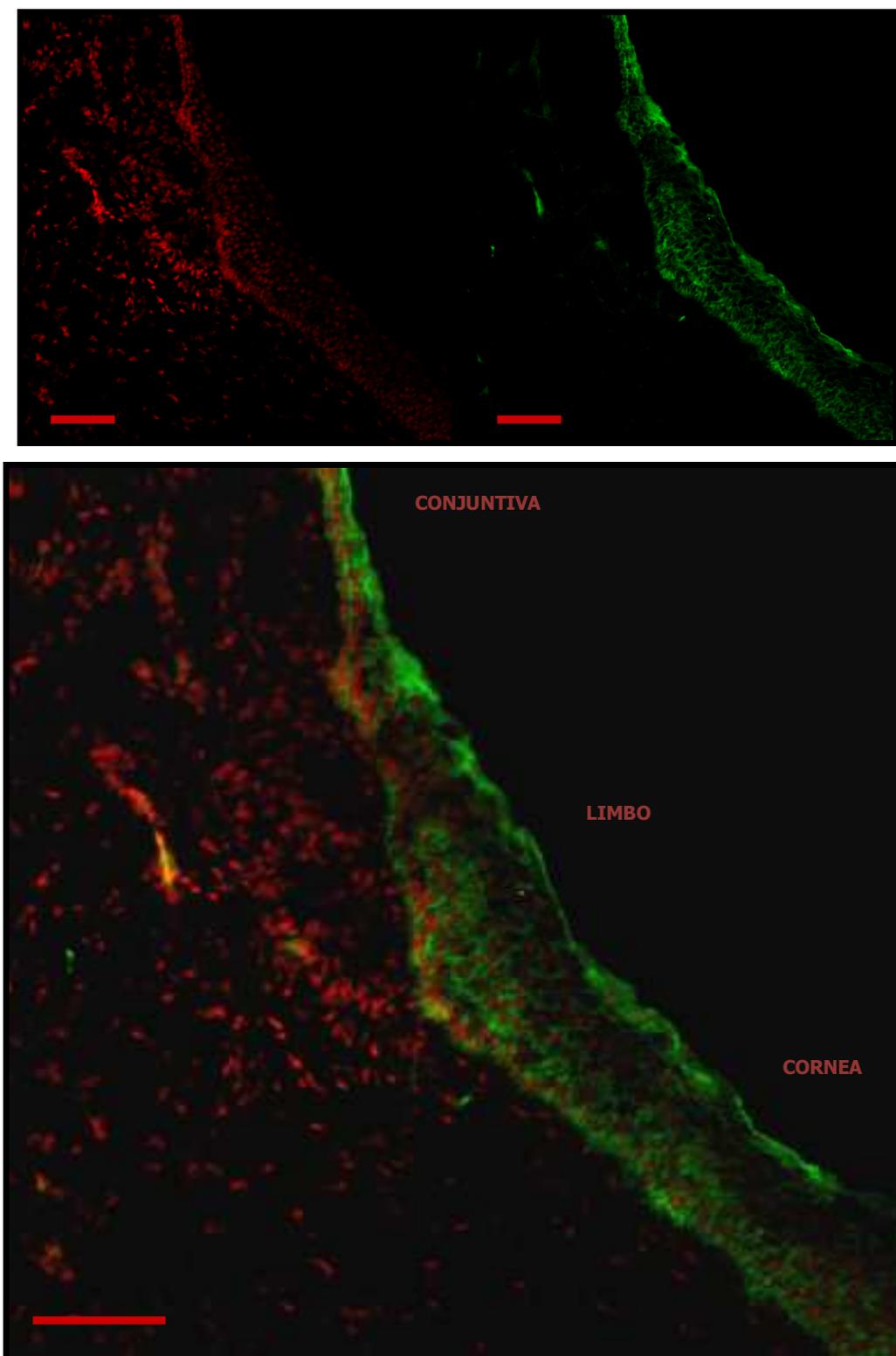


Figura 27: Expresión de desmoplaquina en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu\text{m}$ .

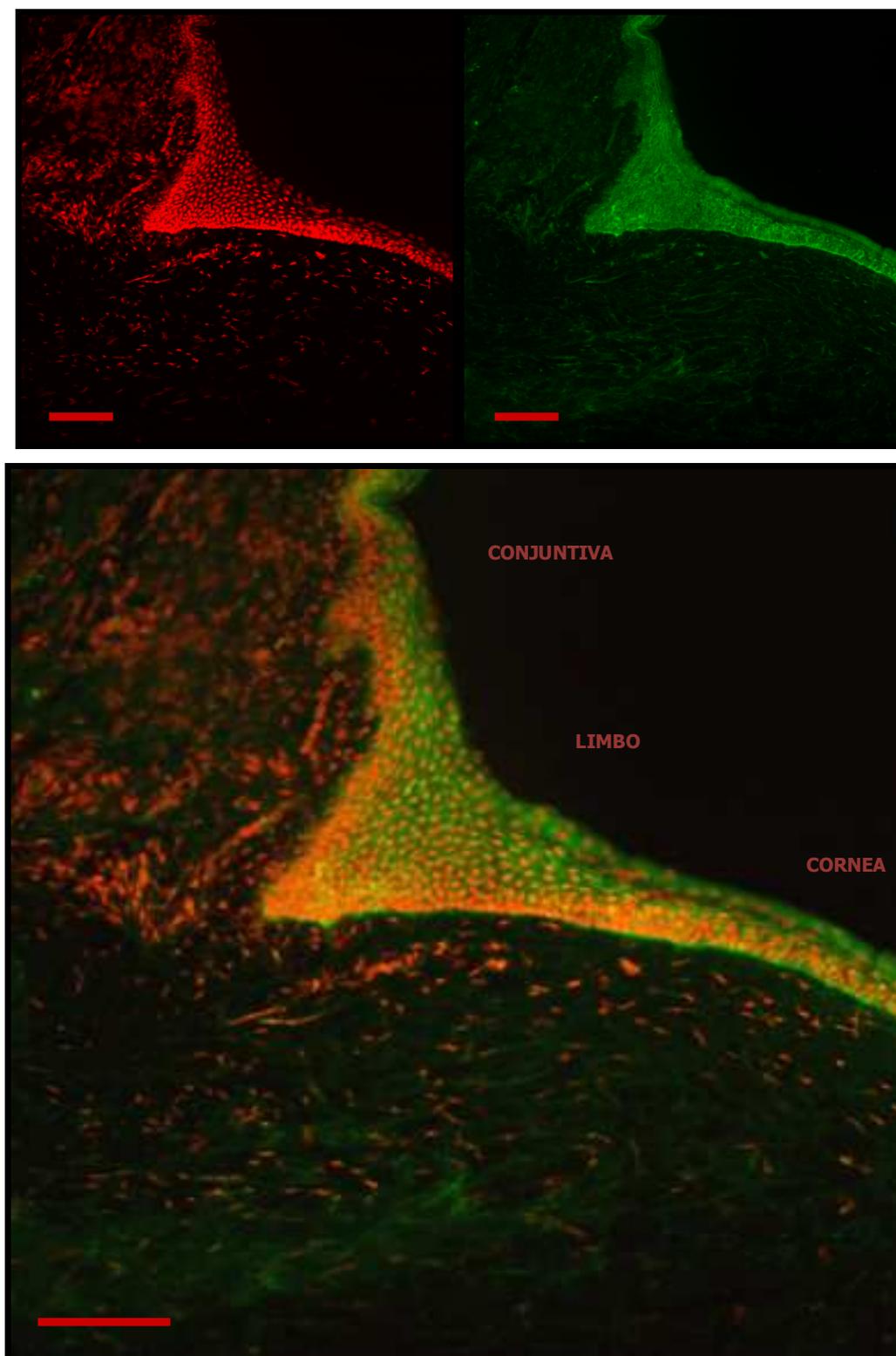


Figura 28: Expresión de integrina  $\beta 1$  en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu\text{m}$ .

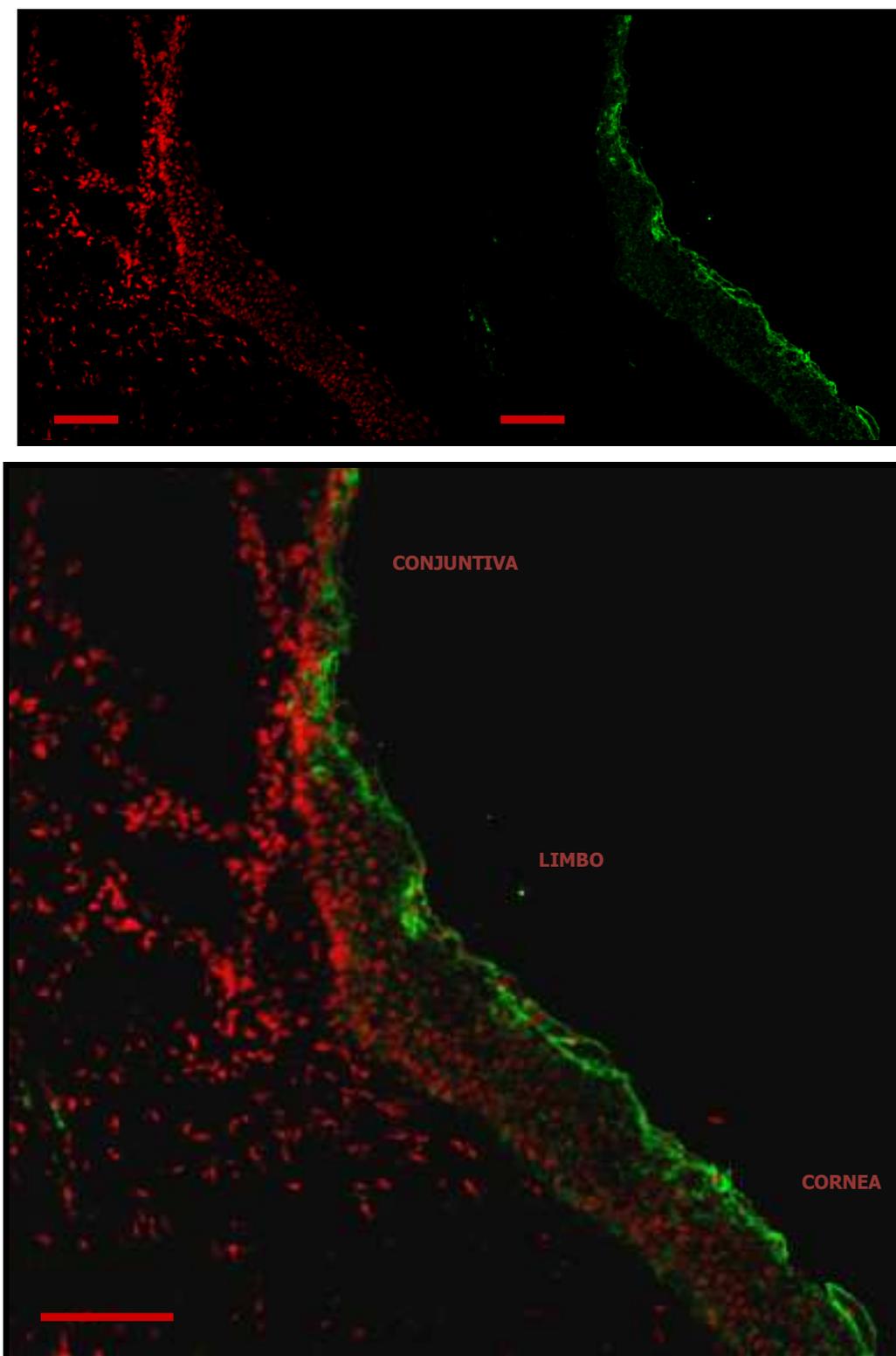


Figura 29: Expresión de pan-citoqueratina en el tejido limbar del cerdo. La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

La desmoplaquina apareció fuertemente expresada en el epitelio corneal, limbar y conjuntival, aunque mostrando una mayor intensidad de fluorescencia en la capa de células más superficiales y las células de las regiones basal y suprabasal, mientras que las células que constituyen las capas intermedias presentaban poca o nula expresión de este marcador (Figura 27). A nivel estromal, únicamente se observó una intensidad leve en la región conjuntival.

La integrina  $\beta 1$  se expresó intensamente y de manera homogénea en toda la región epitelial de las secciones de tejido ocular porcino, limbo córnea y conjuntiva (Figura 28). Aunque, a nivel de la córnea periférica apareció una mayor intensidad de fluorescencia en la capa de células en contacto con la lámina basal. El patrón de intensidad a nivel estromal fue moderado y homogéneo, en las tres regiones de la superficie ocular estudiadas.

La fluorescencia para la pancitoqueratina apareció en todas las capas de los epitelios corneal, limbar y conjuntival (Figura 29). Aunque en la capa de células más superficiales de estos epitelios se observó una mayor intensidad de fluorescencia. A nivel de sustancia propia la intensidad fue nula tanto a nivel corneal, como conjuntival y limbar.

### **3.2.- POBLACIONES CELULARES**

Las células de naturaleza estromal en P0 y P1 y las células epiteliales en P0 expandidas ex vivo bajo las condiciones de cultivo establecidas, fueron sometidas a estudios de expresión de marcadores mediante inmunofluorescencia para definir de una manera fiable su naturaleza.

### ALDH1A1

Tanto los fibroblastos en P0 y P1, como las células epiteliales en P0 mostraron una fluorescencia intensa a nivel citoplasmático para este marcador (Figura 30).

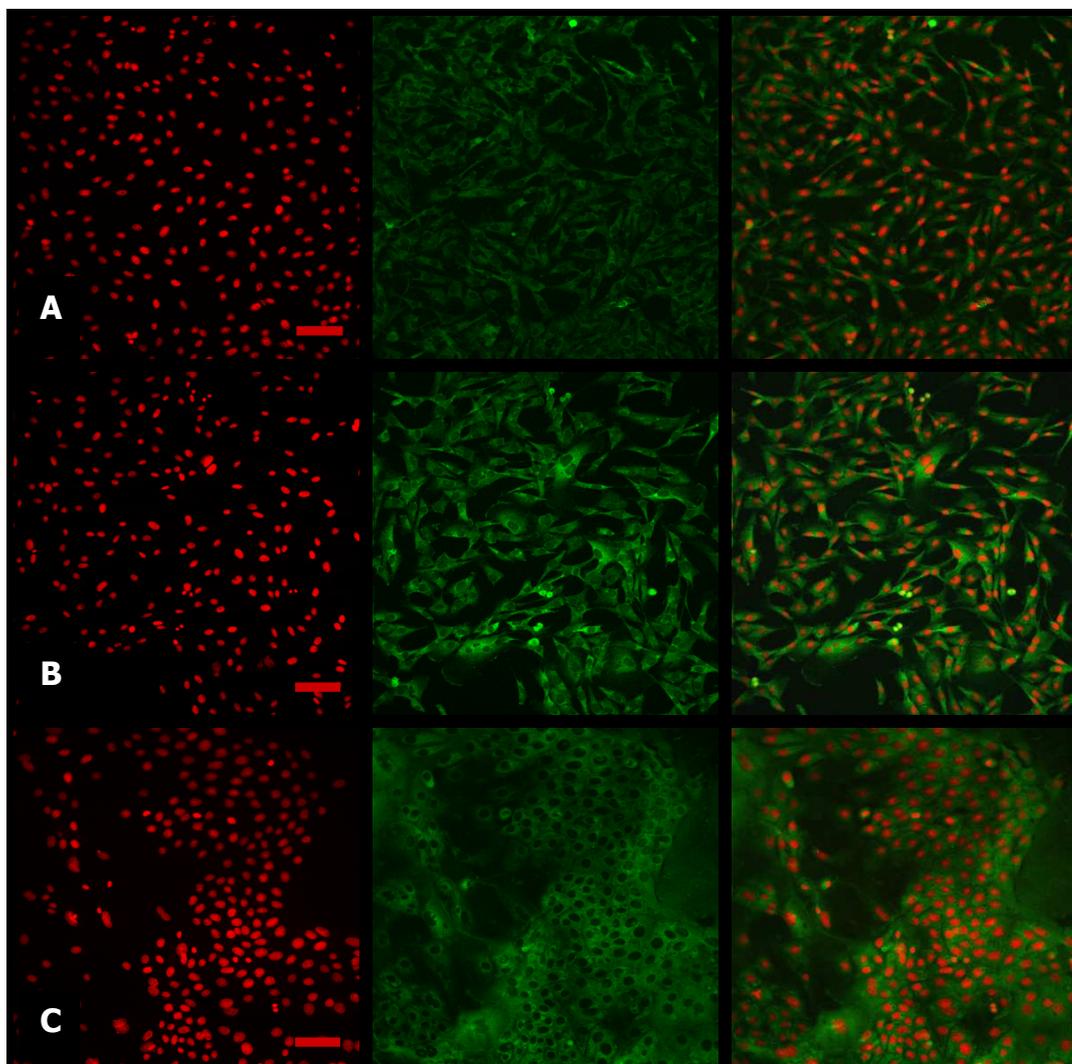


Figura 30: Expresión de la aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100 µm.

### **$\alpha$ -SMA:**

Se observó una expresión generalizada a nivel citoplasmático en toda la población de células fibroblásticas, independientemente del pase, y de células epiteliales. En los fibroblastos en P1 aparecieron fibras de estrés de actina de gran intensidad de fluorescencia, que no se evidenciaron en los P0 de células fibroblásticas o epiteliales (Figura 31).

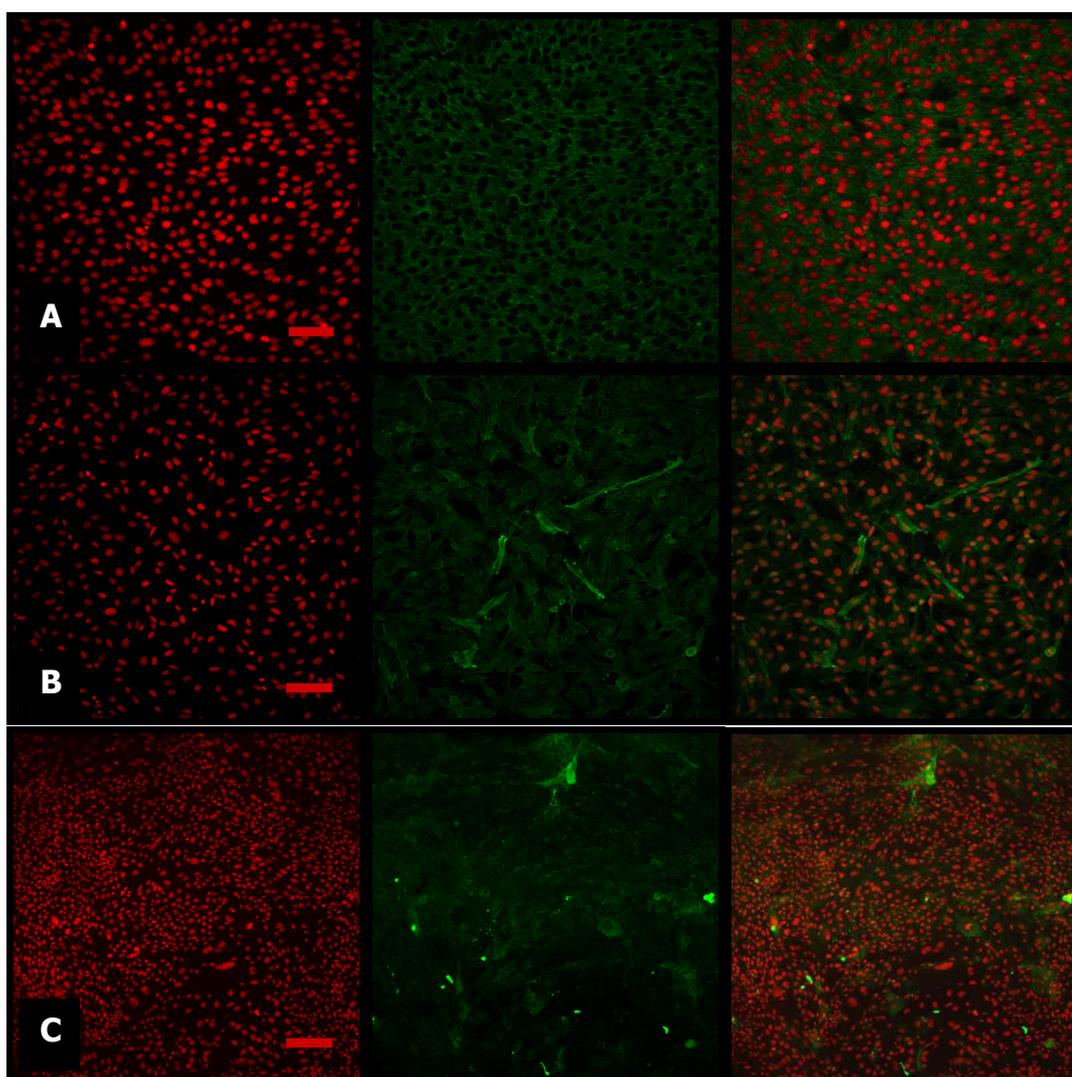


Figura 31: Expresión de la alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x (A y B) y 10x (C) . Barras: 100  $\mu$ m.

### COLAGENO TIPO II:

Tanto los fibroblastos como las células epiteliales, fueron claramente positivas para la expresión de colágeno de tipo II, mostrando una clara e intensa fluorescencia verde a nivel citoplasmático. En el caso de los fibroblastos, la intensidad de fluorescencia varió en función del pase en el que se encontraban las células, siendo ligeramente menor en P0 que en P1 (Figura 32).

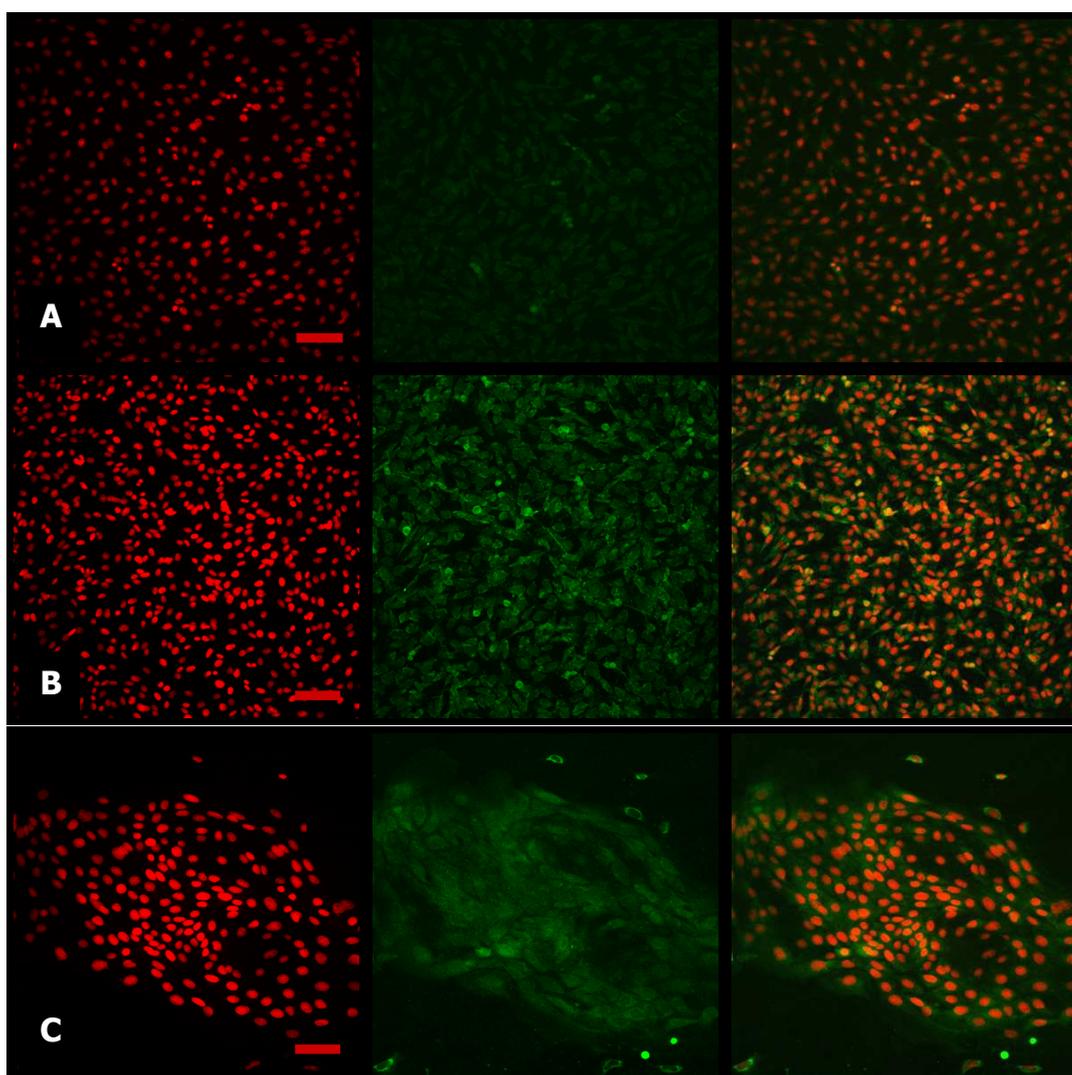


Figura 32: Expresión de colágeno de tipo II en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

### CONEXINA 43:

Este marcador apareció expresado en las células fibroblásticas, tanto en P0 como en P1, de un modo especial. De este modo, se observó una fluorescencia difusa por todo el citoplasma celular, como de una forma localizada a modo de punteado.

En las células epiteliales, se observó una intensa línea de fluorescencia a nivel de la membrana plasmática, en las zonas de contacto intercelular. Al igual que sucede con las células fibroblásticas apareció un ligero patrón punteado (Figura 33).

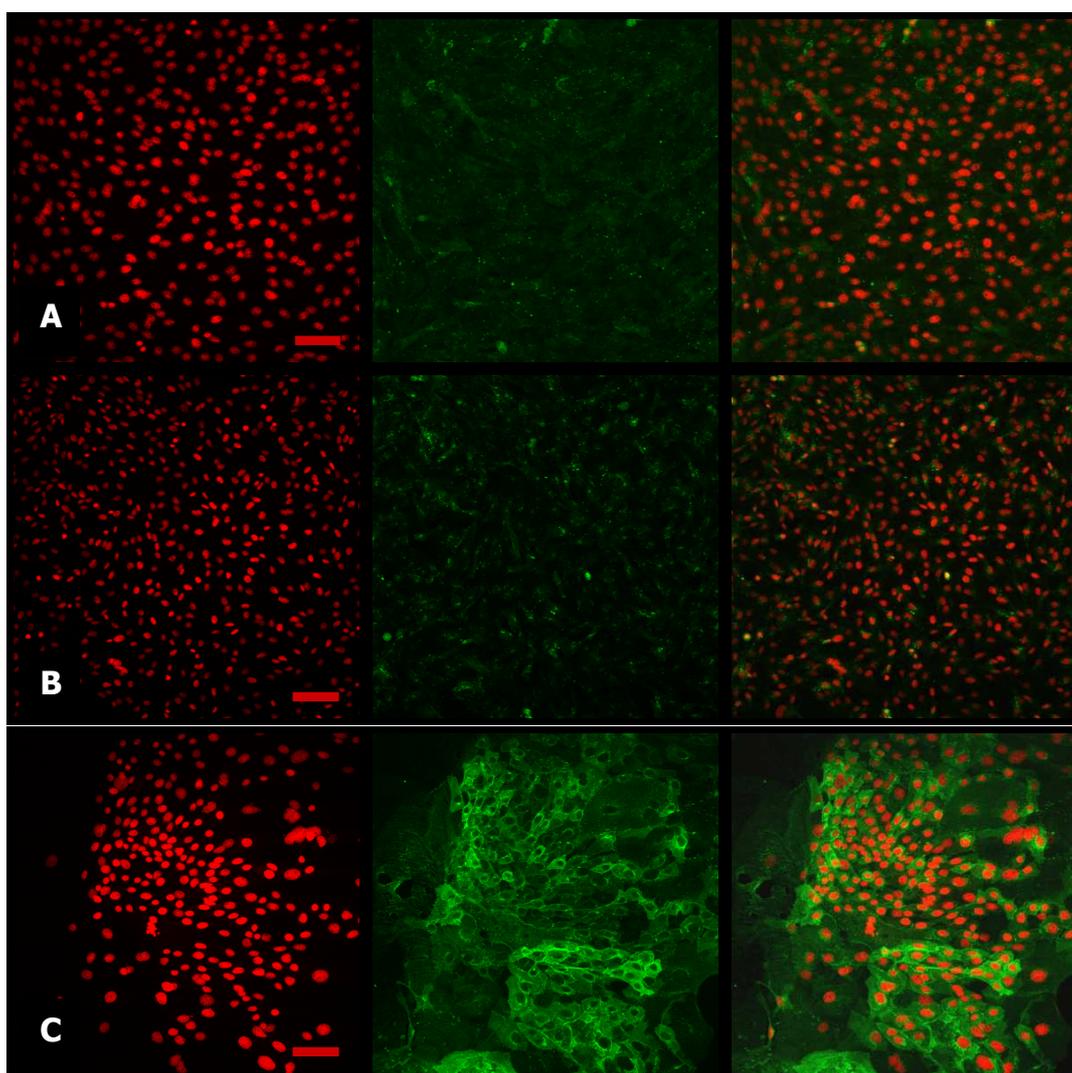


Figura 33: Expresión de connexina43 (Cx43) en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

### DESMOPLAQUINA:

En la población fibroblástica se evidenció una clara fluorescencia a nivel citoplasmático, tanto en P0 como en P1 sin diferencias aparentes de expresión entre ambos pases (Figura 34).

En los cultivos de células epiteliales se apreció una intensa fluorescencia a nivel de las líneas de contacto intercelular, además de una expresión generalizada por el resto del citoplasma.

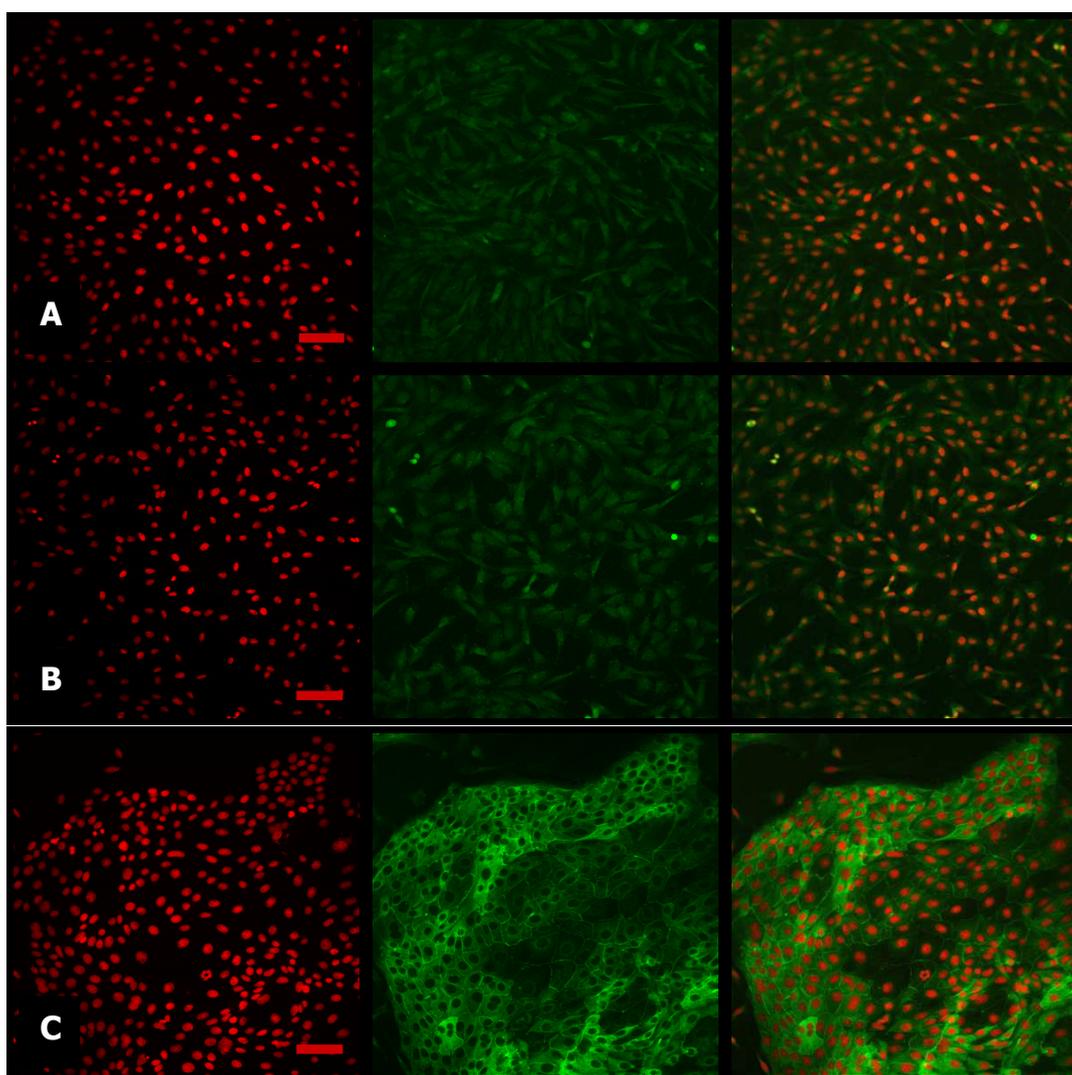


Figura 34: Expresión de desmoplaquina en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

### INTEGRINA $\beta 1$ :

Tanto las células fibroblásticas en P0 y P1, como las células epiteliales en P0, mostraron una intensa fluorescencia para este marcador. Mientras que para las células fibroblásticas el patrón de fluorescencia fue evidente casi exclusivamente a nivel citoplasmático, en los cultivos de células epiteliales apareció una mayor intensidad de fluorescencia en las líneas de contacto intercelular (Figura 35).

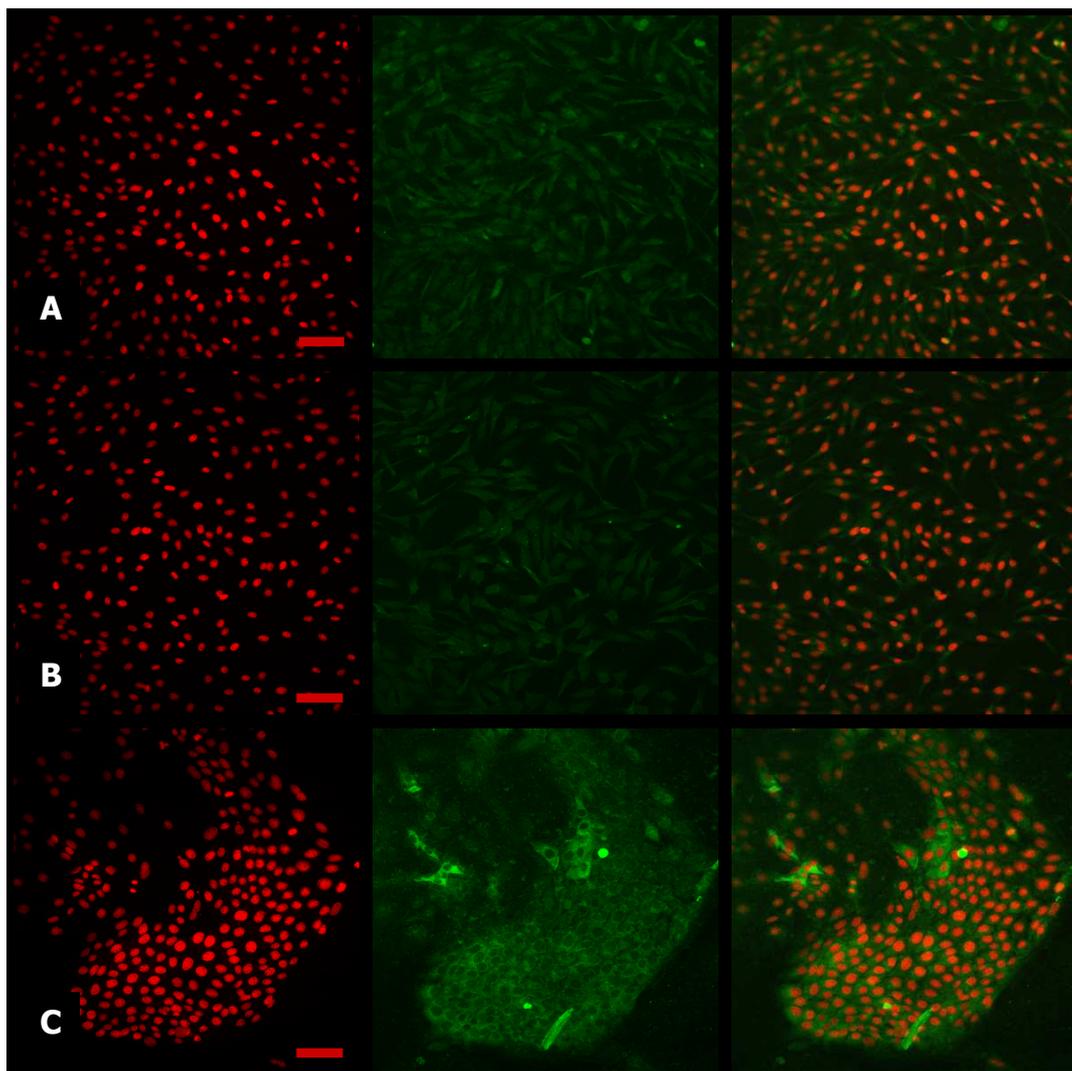


Figura 35: Expresión de integrina  $\beta 1$  en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu\text{m}$ .

### PAN-CITOQUERATINA:

Los fibroblastos en P0 y P1 fueron negativos para la expresión de pan-citoqueratina, hallazgo fundamental para excluir su naturaleza epitelial (Figuras 36A y 36B).

Las células de supuesto origen epitelial, sin embargo, resultaron claramente positivas para este marcador, lo que confirmó su estirpe (Figura 36 C).

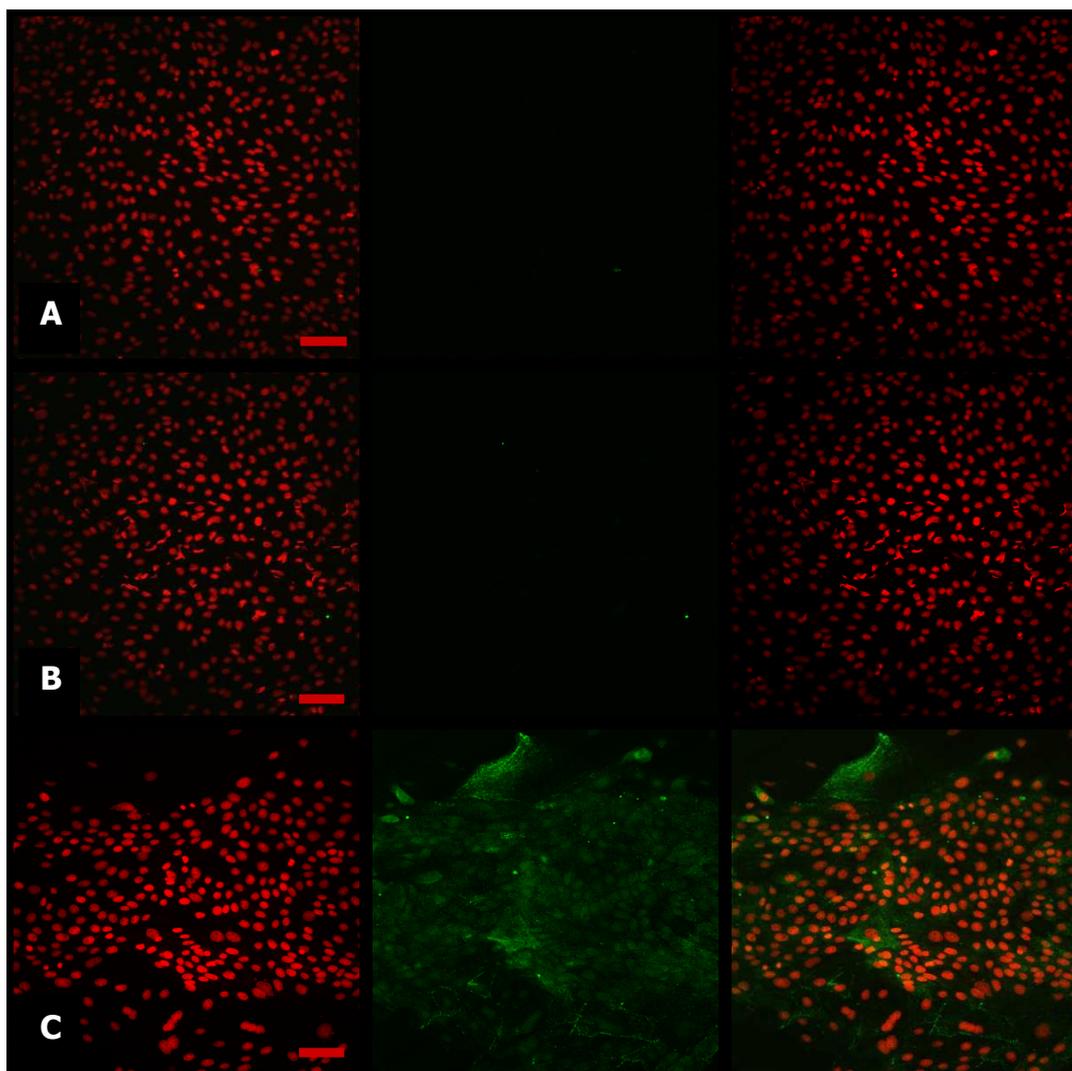


Figura 36: Expresión de pan-citoqueratina en las células fibroblásticas en P0 (A) y P1 (B) y las células epiteliales en P0 (C). La fluorescencia verde se corresponde con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. La fluorescencia roja se debe al contrastado de los núcleos celulares con yoduro de propidio. Magnificación: 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

## 4.- ENSAYOS DE MULTIPOTENCIALIDAD

### 4.1.- DIFERENCIACION OSTEOGENICA

La diferenciación osteogénica fue inducida mediante la incubación de las células derivadas del estroma limbar en P1. Para ello, se incubaron durante 21 días en un medio de inducción suplementado con  $\beta$ -glicerolfosfato, dexametasona y ácido ascórbico. Durante este tiempo, las células aisladas del estroma limbar continuaron proliferando sin sufrir cambios de morfología aparentes.

Al término del período de incubación, las células inducidas teñidas con "alizarin red" mostraban agregados y depósitos de calcio de color rojo intenso. Esta coloración fue visible tanto macroscópicamente (Figura 37A) como a nivel microscópico (Figura 37B y 37C). Las células cultivadas como control, empleando el mismo protocolo de tinción, no presentaban muestras visibles de mineralización.

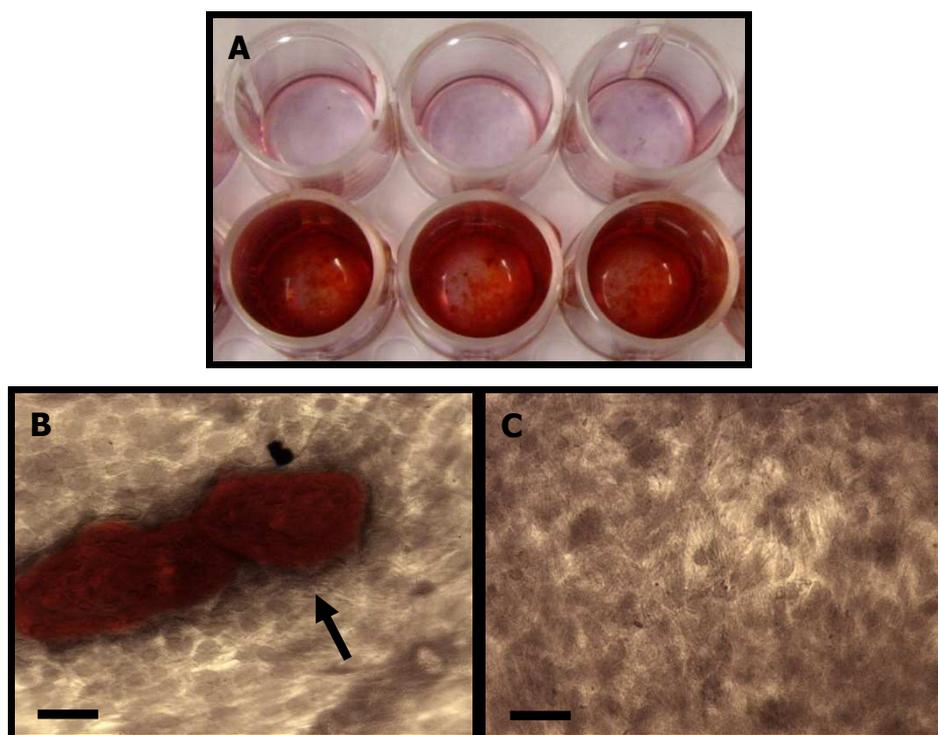


Figura 37: Resultados de los ensayos de diferenciación osteogénica. (A) Macroscópicamente, en los pocillos de las células inducidas, apareció un claro marcaje de color rojo que indica la existencia de mineralización y por tanto la diferenciación. Los pocillos superiores, correspondientes a células no inducidas no aparecían teñidos. (B) Microscópicamente, los cultivos de células inducidas con medio osteogénico, mostraban depósitos de mineral teñidos de color rojo (flecha), (C) mientras que en las células no inducidas no aparecían ese tipo de depósitos. Magnificación:20x (B y C). Barras: 100  $\mu$ m.

#### 4.2.- DIFERENCIACION ADIPOGENICA

Para la diferenciación adipogénica, las células de naturaleza estromal fueron incubadas durante 3 semanas en contacto con el MCIA. A lo largo del período de cultivo, las células mostraban un crecimiento típico de células fibroblásticas, sin cambios notables en cuanto a su morfología y manteniendo las prolongaciones citoplasmáticas típicas de los fibroblastos.

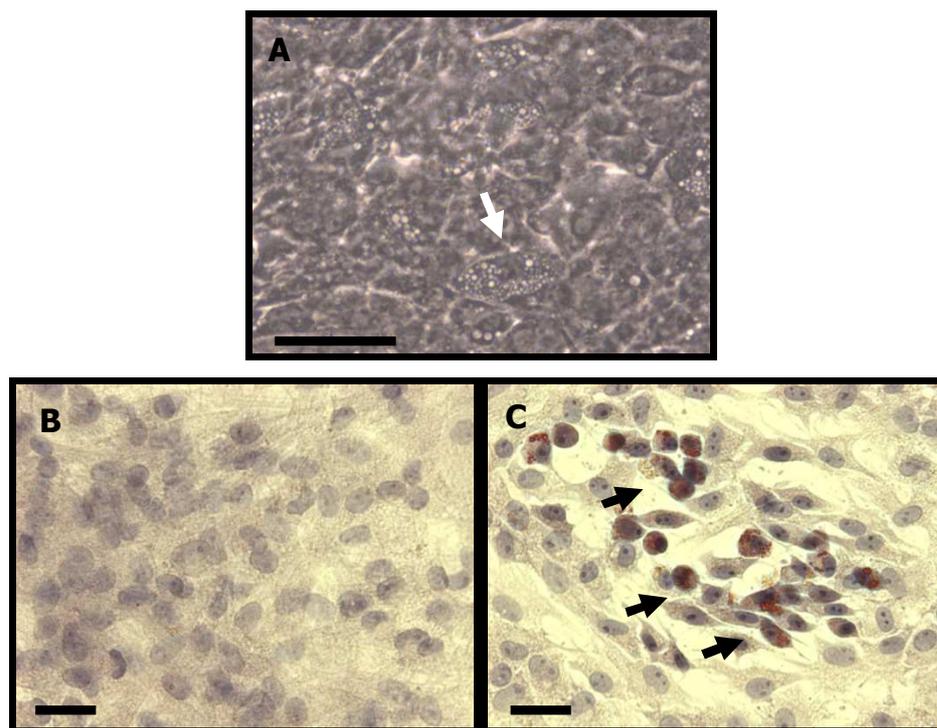


Figura 38: Resultados de los ensayos de diferenciación adipogénica. (A) A la semana de inducción, ya se podían observar bajo el microscopio, algunas células que presentaban vesículas refringentes en su citoplasma (flecha blanca), aunque no se evidenciaron cambios de morfología aparentes. (B) Los cultivos no inducidos teñidos con la solución de "Oil Red O", sólo mostraban tinción a nivel nuclear debido al contrastado con hematoxilina. (C) En los cultivos sometidos a inducción, parte de la población celular mostraba pequeñas vesículas de lípidos en su citoplasma, teñidas de rojo por el "Oil Red O". Magnificación: 40x (A) y 20x (B y C). Barras: 100  $\mu$ m.

A los pocos días de cultivo ya se podían apreciar, bajo el microscopio óptico invertido de contraste de fases, algunas células dispersas que contenían gotas de lípidos en el interior de su citoplasma (Figura 38A).

En los cultivos control, mantenidos durante 21 días con MCF, no se apreció la existencia de gotas de lípidos a nivel citoplasmático (Figura 38B). La aparición de vacuolas lipídicas en el interior de las células diferenciadas fue revelada mediante

tinción con "Oil Red O" (Figura 38C). Cerca de un 20% de toda la población celular mostró la adquisición de fenotipo típico de células del linaje adiposo.

#### 4.3.- DIFERENCIACION CONDROGENICA

Las células incubadas con MCIC, suplementado con dexametasona, ácido ascórbico, insulina y TGF- $\beta$ 1, fueron teñidas con azul alcian tras 21 días de incubación para revelar la síntesis de glucosaminoglucanos sulfatados, propios de los condrocitos.

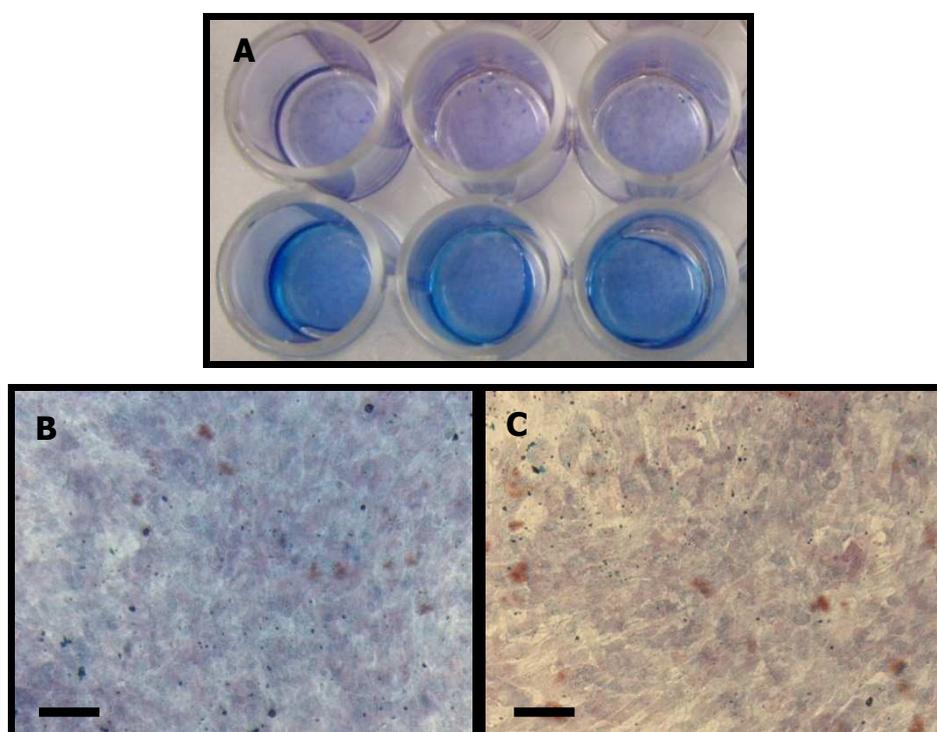


Figura 39: Resultados de los ensayos de diferenciación condrogénica. (A) Macroscópicamente, en los pocillos de las células inducidas, aparece un marcaje azul intenso, mientras que en los pocillos superiores, correspondientes a células no inducidas, la intensidad de la tinción es menor. (B) Microscópicamente, los cultivos de células inducidas con medio condrogénico, aparecen teñidos de una tono azul más intenso, (C) mientras que en las células no inducidas, al igual que macroscópicamente la intensidad de la tinción es menor. Magnificación: 20x (B y C). Barras: 100  $\mu$ m.

Durante el desarrollo de los cultivos, las células inducidas experimentaron una proliferación considerable, además de producirse entre los 14 y 21 días una retracción evidente de la lámina celular en cultivo, que llegaba a despegarse de la superficie de cultivo (Figura 39A).

Las células inducidas mostraban una mayor tinción de azul alcian en comparación a los cultivos control mantenidos con MCF (Figura 39B y 39C).

## 5.- SUSTITUTIVOS ESTROMALES Y LIMBARES: GFF Y GFCL

### 5.1.- DEFINICION DE LA COMPOSICION DE LOS GELES DE FIBRINA

TIEMPO DE COAGULACION						
4 mg/ml Cl <sub>2</sub> Ca			8 mg/ml Cl <sub>2</sub> Ca			
Medio de cultivo	37°C	15 min	Medio de cultivo	37°C	> 2h	
	TA	30 min		TA	> 2h	
Suero	37°C	15 min	Suero	37°C	> 2h	
	TA	30 min		TA	> 2h	
Medio de cultivo	37°C	15 min	Medio de cultivo	37°C	> 2h	80 µg/ml Acido Tranexámico
	TA	30 min		TA	> 2h	
Suero	37°C	15 min	Suero	37°C	1h30min	
	TA	30 min		TA	1h30min	

Tabla 7: Tiempos de coagulación de los geles de fibrina en función de las concentraciones de ácido tranexámico y cloruro cálcico (Cl<sub>2</sub>Ca) utilizadas para la elaboración de los geles. (TA: temperatura ambiente).

Todos los geles de fibrina fueron elaborados preparando un volumen de 2 ml de mezcla de plasma combinado con el resto de aditivos, que fue añadido en una placa de Petri de 35 mm.

No se apreciaron diferencias en cuanto al tiempo de coagulación en función de si se utilizaba medio de cultivo o suero fisiológico como medio base de la formulación del

gel de fibrina. Sin embargo, las matrices elaboradas con suero fisiológico no ofrecían suficiente estabilidad.

En cuanto a la temperatura de incubación, el tiempo empleado para que se produjera se vio ligeramente acelerado a 37°C.

La variación en la concentración de ácido tranexámico no interfirió con el tiempo de coagulación, aunque si se obtuvo una mayor consistencia y resistencia a la rotura cuando se empleó una concentración de 80 µg/ml.

El aumento de la concentración de cloruro cálcico derivó en mayores tiempos de coagulación (más de 2 horas), y, por tanto, retrasó dicho proceso.

## **5.2.- ESTUDIOS DE CRECIMIENTO CELULAR**

En el momento de la coagulación de la matriz de fibrina, los GFF mostraban, bajo el microscopio de contraste de fases, células de morfología redondeada dispersas a lo largo de todo el entramado de fibras de fibrina. Tras 24 horas, las células adoptaban una morfología alargada, típicamente fibroblástica y comenzaban a proliferar dispersándose por todo el andamiaje de manera tridimensional. Las células mostraban sus procesos citoplasmáticos dendríticos estableciendo contactos intercelulares, conformando una densa red celular a medida que evolucionaba el cultivo. Embebidas en esta matriz, las células derivadas del estroma limbar mostraban una gran actividad proliferativa alcanzando, tras 14 días de cultivo, un tamaño poblacional de  $1.194.318 \pm 346.747$  células (Figura 40). Por tanto, las células sufrieron una tasa de expansión de  $119,43 \pm 34,67$ .

Cuando sobre la superficie de los GFF se sembraron células epiteliales, éstas mostraron una rápida adhesión. Tras 24 horas después de la siembra, éstas aparecían con una morfología más alargada, y parecían bastante migratorias, buscando el contacto intercelular. Dentro de los primeros 2-3 días de cultivo, se observó el crecimiento de numerosas células poligonales. Tras un período de cultivo de 14 días, las células llegaban a un estado de confluencia mostrando una morfología típica epitelial en forma de adoquinado.

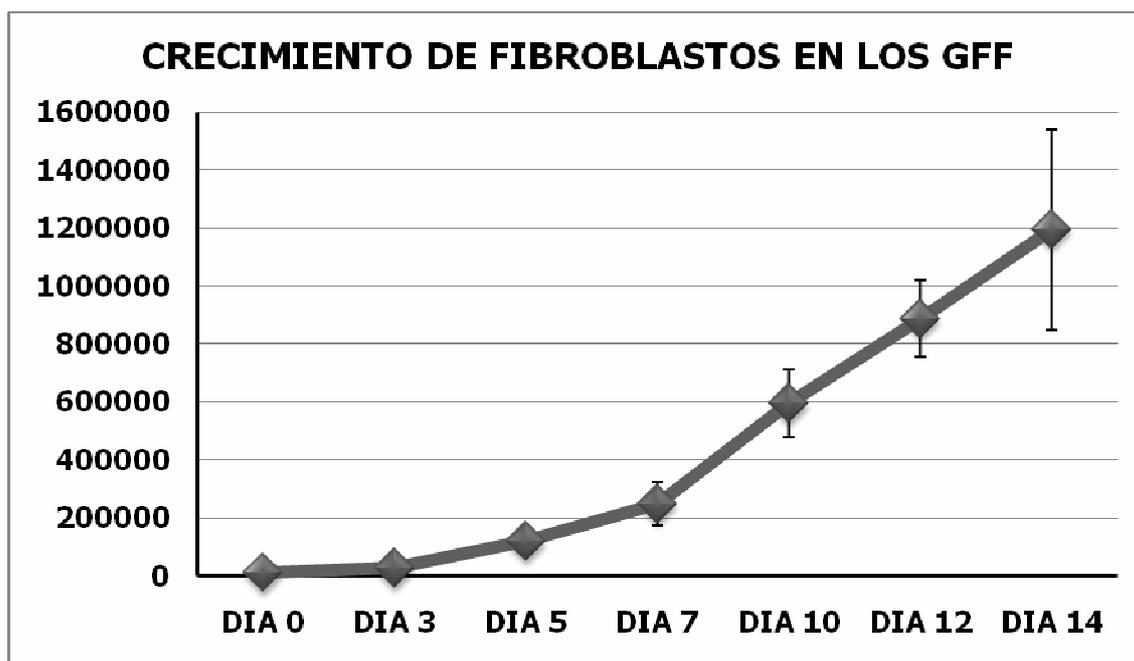


Figura 40: Crecimiento de las células fibroblásticas en el interior de los sustitutos estromales (GFF).

### 5.3.- ESTUDIOS HISTOLOGICOS: MICROSCOPIA OPTICA

El estudio mediante tinción de hematoxilina-eosina de los GFF demostró la dispersión de las células fibroblásticas a lo largo de todo el andamiaje de fibrina (Figura 41A). La evaluación de dichas secciones, recogidas a diferentes tiempos de cultivo (0, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días), demostraba la expansión de la población celular por todo el entramado. Tras 14 y 21 días de cultivo, las células colonizaban el gel de fibrina y, además, el entramado del andamiaje tridimensional de fibrina parecía haber adoptado una nueva consistencia, apareciendo menos compacto y homogéneo que un gel de fibrina acelular (Figura 41B).

Las secciones obtenidas a partir de los GFCL tras 14 y 21 días de cultivo fueron teñidas con hematoxilina/eosina, tinción elástica de van Gieson y azul alcian. Estas secciones fueron comparadas con muestras las de tejido limbar y corneal porcino normales (Figura 42A y 42B).

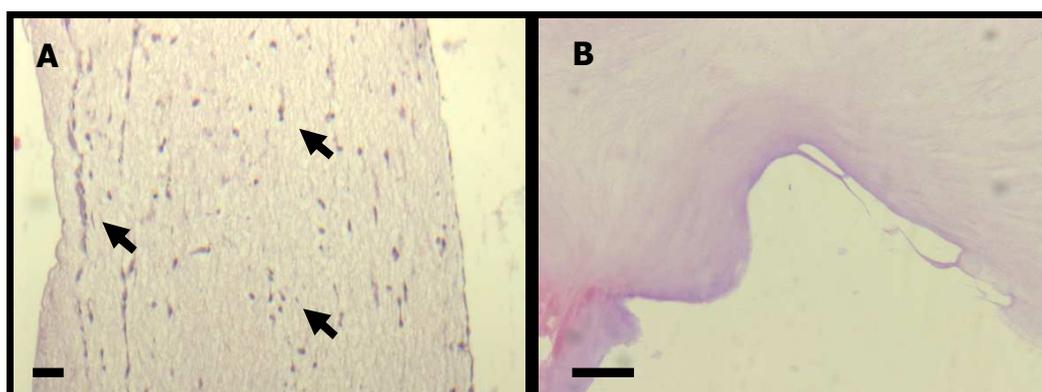


Figura 41: Tinción hematoxilina-eosina. (A) Sustitutivo estromal (GFF) a los 14 días de cultivo, en el que se podía apreciar la existencia de numerosas células dispersas (flechas) y cómo la estructura microscópica del gel de fibrina aparecía más desorganizada. (B) Sección transversal de gel de fibrina sin células, de aspecto homogéneo y compacto. Magnificación 10x (A) y 20x (B). Barras: 100  $\mu$ m.

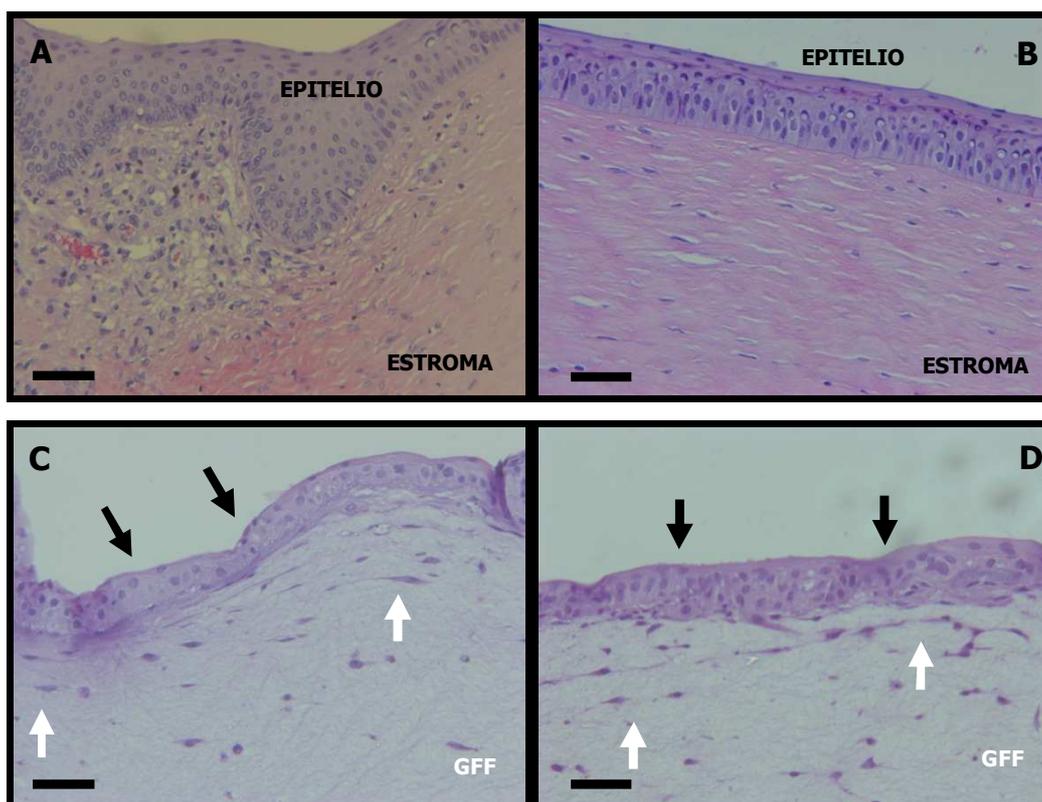


Figura 42: Tinción hematoxilina-eosina de los GFCL. (A) Sección de limbo esclero-corneal y (B) cornea porcinos. (C) Sustitutivo limbar (GFCL) a 14 y (D) 21 días de cultivo, en los que se aprecia el crecimiento de una lámina de epitelio estratificado (flechas negras) sobre los sustitutos limbares (GFF) en cuyo interior se apreciaban células fibroblásticas (flechas blancas). Magnificación 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

Las secciones de hematoxilina/eosina no mostraban diferencias aparentes en cuanto a morfología de la matriz de fibrina o en cuanto a la estratificación del componente epitelial que se encuentra proliferando sobre los GFF, en función de si el GFCL se mantenía 14 o 21 días de cultivo (Figuras 42C y 42D). El entramado de la matriz tridimensional apareció pobremente teñido por la eosina (Figura 42).

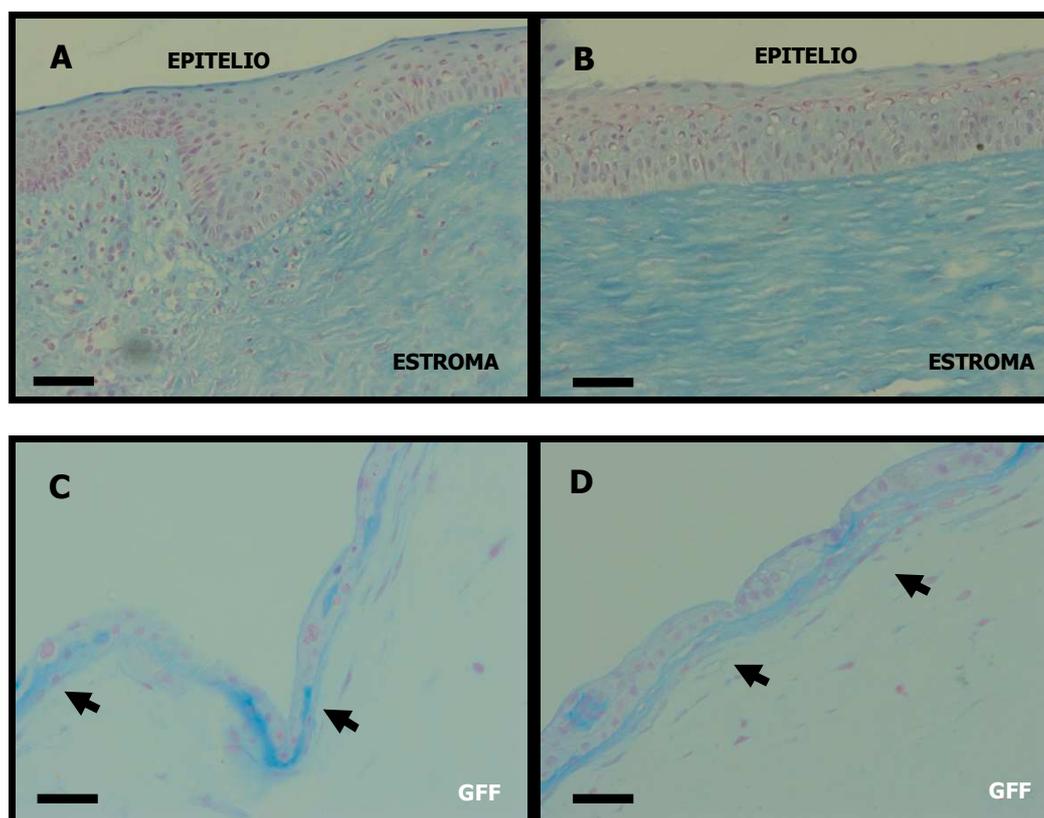


Figura 43: Tinción azul alcian de los GFCL. (A) Sección de limbo esclero-corneal y (B) cornea porcina. (C) Sustitutivo limbar (GFCL) a 14 y (D) 21 días de cultivo en los que se apreció el crecimiento de una lámina de epitelio estratificado, teñido de un tono azulado debido a la existencia de proteoglicanos (flechas negras), sobre los sustitutos limbares (GFF). Magnificación 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

Las secciones de limbo y córnea teñidas con azul alcian, mostraban la existencia de gran cantidad de proteoglicanos en el estroma, tanto corneal como conjuntival y limbar. Además, en el epitelio también apareció un tono azulado, más intenso en las capas basal y superficial que en la capa celular intermedia, que demuestra la existencia de proteoglicanos en la región epitelial (Figura 43A y 43B). Las secciones obtenidas para los GFCL a los 14 y 21 días de cultivo mostraron una pobre expresión de proteoglicanos en el GFF, mientras que en la zona de células epiteliales que proliferaba

en su superficie se apreció ya a los 14 días de cultivo ciertas zonas positivas para proteoglicano (Figura 43C), que tras 21 días de cultivo aparecieron fuertemente localizadas sobre todo a nivel basal, en contacto con el GFF (Figura 43D).

La tinción de las secciones de limbo y córnea mediante tinción elástica de van Gieson, reveló el gran contenido de colágeno del estroma, teñido de color rosa fuerte, así como una ligera expresión de esta proteína por parte de las células epiteliales (Figura 44). En el caso de los GFCL teñidos tras 14 y 21 días de cultivo, tanto las células estromales contenidas en los GFF como las células de naturaleza epitelial cultivadas sobre los GFF, aparecen con su citoplasma teñido de rosa-fucsia, mientras que los núcleos muestran un color negro-gris. A pesar de existir una semana de diferencia, entre los GFF con 14 días y los de 21 días en cultivo, tanto a nivel de estratificación epitelial como de aspecto de la matriz de fibrina no aparecen cambios evidentes.

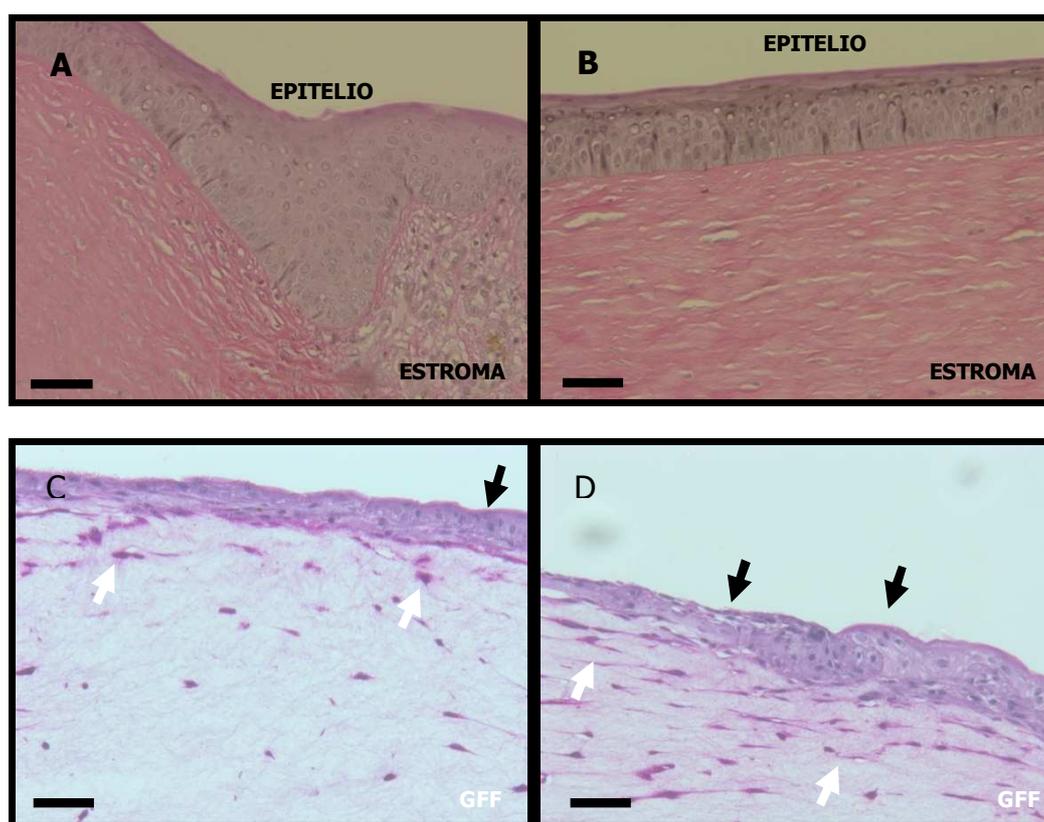


Figura 44: Tinción elástica de van Gieson (A) Sección de limbo esclero-corneal y (B) cornea porcinos. (C) GFCL a 14 y (D) 21 días en los que se apreció el crecimiento de una lámina de epitelio estratificado, teñido de rosa intenso debido a la existencia de colágeno (flechas negras), sobre los sustitutos limbares (GFF), en el interior de los cual se apreciaban células fibroblásticas (flechas blancas). Magnificación 20x. Barras: 100  $\mu$ m.

#### 5.4.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES: MEB

El análisis mediante MEB de los GFF corroboró la adhesión de las células de naturaleza estromal al entramado de moléculas de fibrina (Figura 45). Se vió que este tipo celular adoptaba una morfología típicamente fibroblástica, emitiendo sus características prolongaciones citoplásmicas, estableciendo contacto con las células circundantes y llegando a conformar un entramado celular para llegar a colonizar el andamiaje tridimensional.

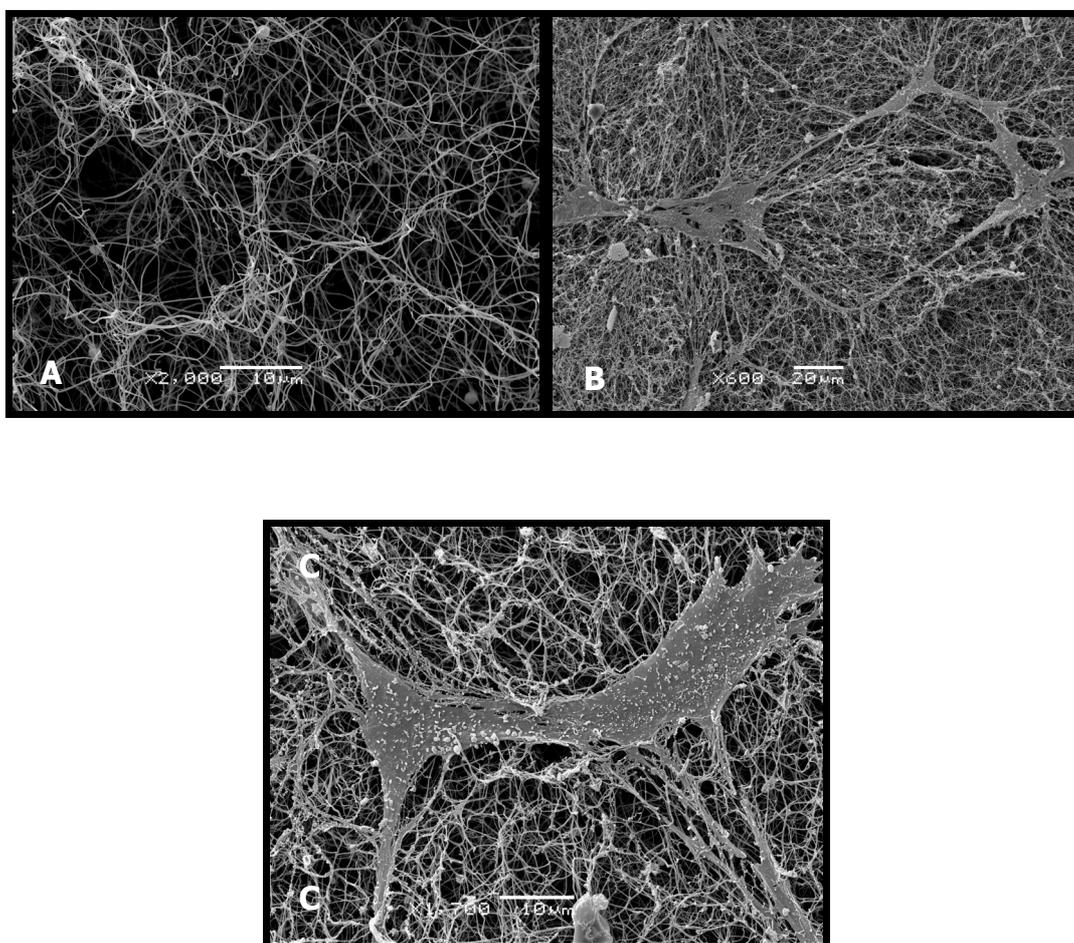


Figura 45: Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de los sustitutos estromales (GFF). (A) El entramado de fibrillas que conforman el gel de fibrina. (B) Las células de naturaleza estromal se adhieren a la estructura de fibrina y proliferaban estableciendo interconexiones a través de sus procesos citoplásmicos. (C) Células de morfología fibroblástica adherida a las fibrillas del gel de fibrina.

La observación mediante MEB de la superficie de los GFCL mostraba un crecimiento celular a modo de adoquinado, que colonizaba la superficie de los GFF. Esta población celular aparecía con una morfología poligonal, estableciendo estrechos contactos con las células vecinas (Figura 46).

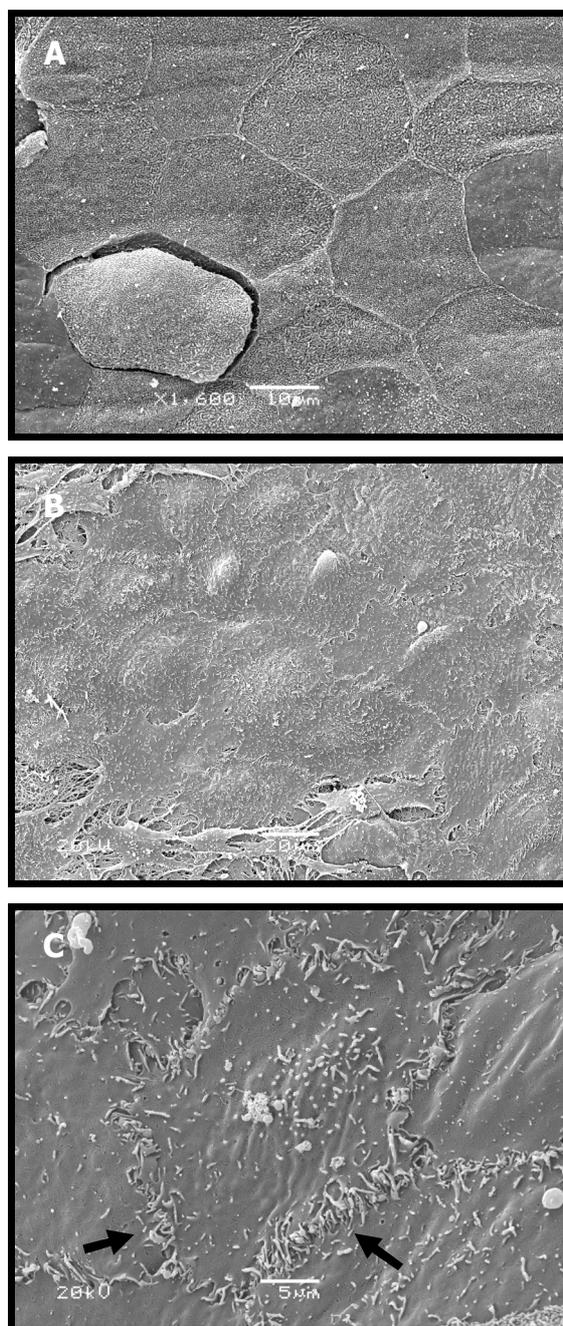


Figura 46: Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie de los sustitutos limbares (GFCL). (A) Aspecto de la superficie del epitelio corneal porcino normal. (B) Crecimiento de células epiteliales sobre la superficie de los sustitutos estromales (GFF), constituyendo el GFCL. (C) Las células epiteliales cultivadas sobre los GFF mostraban una morfología claramente poligonal, estableciendo uniones intercelulares evidentes (flechas).

### **5.5.- PROPIEDADES MECANICAS: CONTRACCION DE LOS GFF**

Al final del período de cultivo, no se observó retracción de los GFF en el interior de los recipientes de cultivo. Los geles mantenían su diámetro inicial de 1,6 cm y la adhesión mediante capilaridad a las paredes del pocillo. Sin embargo, sí que se pudo observar un ligero adelgazamiento de los geles de aproximadamente 2,5 mm en la región central, alcanzando un grosor final de 1 mm, tras 14 días de cultivo. Cuando los GFF fueron recuperados de los pocillos y tratados con etanol, para su deshidratación, mostraron un diámetro de gel de  $1,20 \pm 0,11$  cm a día 0 y  $1,12 \pm 0,09$  cm a día 14 ( $p < 0,05$ ), experimentando un porcentaje de contracción de  $25,00 \pm 7,01$  y  $30,13 \pm 5,97\%$ , a los 0 y 14 días respectivamente, con respecto al diámetro que presentaban en el pocillo. Cuando los GFF fueron nuevamente rehidratados en medio de cultivo, estos mantuvieron un diámetro medio de  $1,19 \pm 0,11$  para los geles a día 0 y de  $1,11 \pm 0,09$  para los geles a día 14 ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, aunque los procesos de deshidratación y rehidratación sobre los geles a día 0 y día 14 no afectaron al diámetro de los mismos ( $p = 0,89$  y  $p = 0,90$ , respectivamente), fue evidente la existencia de una contracción de los mismos, probablemente asociada con el crecimiento celular. En términos de grosor, los GFF recuperados de los pocillos tratados con etanol y medio de cultivo mantenían el espesor de 1 mm que ya presentaban en el interior de los recipientes de cultivo tras los 14 días de cultivo in vitro.

## **V.- DISCUSSION**

## **V.- DISCUSION**

Durante la última década la terapia celular se ha convertido en una herramienta clave para el tratamiento de multitud de patologías. Así, el trasplante de queratinocitos para el tratamiento de quemaduras o ulceraciones de la piel, el implante de condrocitos autólogos en lesiones del cartílago articular, el trasplante de islotes pancreáticos para el tratamiento de la diabetes o el de precursores hematopoyéticos en algunos tipos de enfermedades neoplásicas, se encuentran dentro de las terapias más reconocidas basadas en el trasplante celular.

Del mismo modo, el trasplante de CMEL expandidas ex vivo ha demostrado resultados exitosos a largo plazo en el tratamiento del SIL, lo que ha convertido a este tipo de técnicas en una de las aplicaciones de terapia celular más aceptadas y extendidas en la actualidad<sup>30</sup>.

Aún así, quedan pendientes muchas cuestiones por resolver antes de que este tipo de técnicas puedan considerarse como de aplicación clínica consolidada. En primer lugar, no existe un protocolo único, definido, para el aislamiento y la expansión ex vivo de las CMEL, sino que diferentes grupos de investigación han descrito diversas técnicas que difieren tanto en el sistema de establecimiento de los cultivos como en el tipo de soportes o materiales utilizados para la expansión de este tipo celular. Por otra parte, debido a la inexistencia de un marcador definitivo que permita la identificación de las CMEL, las actuales técnicas son incapaces de definir la naturaleza real de las láminas de células trasplantadas<sup>15;16;36;37</sup>. Por último, el desconocimiento de la mayoría de los mecanismos que mantienen el nicho en el que se encuentra esta población de células madre en el tejido nativo in situ, complica considerablemente la definición y reproducibilidad de dicho microambiente bajo condiciones in vitro, lo que dificulta a su vez el mantenimiento del fenotipo de las CMEL<sup>54</sup>.

Con el fin de intentar solventar algunas de estas cuestiones, en el presente estudio se ha definido la construcción de un sustitutivo de tejido limbar porcino de naturaleza totalmente autóloga, persiguiendo reproducir, de la manera más fiable posible, las condiciones en las que las CMEL se encuentran en el tejido nativo. Para ello, en primer lugar, se ha establecido un nuevo método de digestión de las muestras de tejido limbar que permite, a partir de una mínima biopsia limbar, optimizar el aislamiento de

los dos principales componentes celulares presentes en este tipo tisular. Posteriormente, empleando técnicas de ingeniería tisular, se ha definido la construcción de un sustitutivo del estroma limbar, utilizando un andamiaje tridimensional de fibrina en el que se han introducido células propias del estroma limbar, el GFF, a partir del cual, y mediante el cultivo en su superficie de células aisladas del epitelio limbar se ha definido la composición final del sustitutivo de tejido limbar o GFCL.

### **1.- ORIGEN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

La mayoría de estudios experimentales previamente publicados que no utilizan material biológico de origen humano se centran, básicamente, en la utilización de modelos basados en animales de pequeño tamaño como el conejo. A este respecto, el modelo animal de elección para el desarrollo del presente trabajo, el cerdo, representa una buena alternativa. En primer lugar, se trata de la especie de mamífero que parece tener más homología con la especie humana. En segundo lugar, el origen porcino de las muestras biológicas utilizadas ha permitido solventar los problemas asociados a la disponibilidad del tejido ocular de origen humano. Si bien cabe la posibilidad de utilizar restos tisulares de botones esclero-corneales humanos, que son desechados tras la realización de un trasplante corneal convencional, esto se ve limitado por cuestiones legales. La actual legislación vigente en cuanto a la utilización de dichos tejidos, detalla la necesidad expresa de la autorización por parte del donante para el uso de esos restos tisulares en investigación lo cual, en muchos casos no es posible y por tanto complica el proceso de obtención de muestras tisulares.

En último lugar, y no por ello menos importante, la elección de un modelo experimental porcino tiene como objeto la realización de un estudio posterior de la potencial aplicabilidad terapéutica del GFCL en el tratamiento de las alteraciones de la superficie ocular englobadas como SIL. Esto es muy interesante, en tanto que no sólo se pretende demostrar la aplicación terapéutica de este tipo de injertos, sino a su vez definir las ventajas del implante de material biológico de origen autólogo. En este sentido, las ventajas de utilizar un animal con un ojo de tamaño y características tan similares al humano son incuestionables. Además, recientemente se ha señalado el

limbo del cerdo como muy similar al humano, lo cual refuerza aún más el futuro del empleo de un modelo porcino para el estudio de la recuperación de ceguera en el ser humano como consecuencia de daño límbico.

## **2.- TECNICAS DE DIGESTION Y EXPANSION CELULAR**

Hasta el momento, los métodos descritos para el aislamiento y expansión ex vivo de las CMEL son variados. La mayoría de las técnicas utilizadas se basan en la utilización de protocolos de cultivo a partir de explantes de tejido limbar.

Aunque el establecimiento de cultivos a partir de explantes se trata de una técnica bastante sencilla que consigue la obtención de láminas de epitelio viables gracias a la migración de las células epiteliales a partir del explante, su utilización lleva asociadas algunas desventajas. Así, la migración a partir del explante parece ser un proceso selectivo, dándose una proliferación preferencial de las células que se encuentran en la periferia del explante o en contacto con la superficie de cultivo, lo que lleva a la posibilidad de que realmente no se trate de CMEL sino de CAT las que conforman la capa de células epiteliales expandida. Por otra parte, al tratarse de biopsias de tejido limbar que comprenden toda la anatomía tisular, en el cultivo pueden aparecer problemas asociados a la contaminación cruzada producida por los fibroblastos del estroma que se encuentran en la muestra tisular.

Para evitar los problemas asociados a esta contaminación cruzada varios autores han desarrollado técnicas de aislamiento de láminas de epitelio limbar mediante técnicas principalmente enzimáticas (dispasa), con el fin de poder utilizarlas bien para el cultivo directo a modo de explante o bien para poder obtener suspensiones celulares aisladas a partir de ellas<sup>91;151</sup>.

Los primeros protocolos descritos para la obtención de suspensiones de células epiteliales a partir del tejido limbar se basaban en la utilización de un método descrito por Rheinwald y Green, en 1975, para el aislamiento de queratinocitos de piel<sup>152</sup>. Este método consistía en un tratamiento de las muestras tisulares con una solución de T/E, que actúa directamente sobre la región epitelial. Sin embargo, mediante esta técnica de aislamiento, no se evita el problema de la contaminación cruzada con células

fibroblásticas, ya que la acción de esta enzima también parece aislar, en menor medida, parte de las células que constituyen el estroma. Por otra parte, la acción de la tripsina se da de manera selectiva sobre las capas más externas del tejido a digerir, por lo que las células más basales, entre las que se encuentran las CMEL son las últimas en aislarse. Además, se ha descrito que la población de células madre presente en el tejido limbar se encuentra localizada en una especie de digitaciones del estroma, lo que probablemente dificulte su aislamiento mediante este tipo de técnicas.

Los procedimientos que implican la separación previa de la capa epitelial del estroma subyacente por acción de la dispasa, desintegrando la lámina basal, permiten evitar la aparición de contaminación fibroblástica. Sin embargo, para poder conseguir suspensiones celulares tanto de fibroblastos como de células epiteliales mediante este tipo de procedimientos, a partir de una única biopsia, las muestras tisulares deben ser sometidas al tratamiento enzimático con tres tipos de enzimas. En primer lugar, una incubación con dispasa para la separación del epitelio y el estroma limbar, tras la cual, y para conseguir suspensiones de células individualizadas, se precisa por una parte de la acción de la tripsina para la individualización de las células epiteliales y por otra parte de la incubación de los restos estromales con una solución de colagenasa para conseguir el aislamiento de los fibroblastos dispersos entre la matriz colágena del estroma.

Con el objeto de disminuir en la medida de la posible la manipulación de las muestras de tejido limbar, así como los posibles daños y disminución de la viabilidad celular asociados a la utilización de los métodos de digestión enzimáticos, se han estudiado dos protocolos de disgregación del tejido limbar, Pest y Pinv, basados en la actuación secuencial de dos enzimas, la T/E y la colagenasa de tipo I.

Utilizando el Pest<sup>124</sup>, las muestras de tejido fueron digeridas en un primer paso en presencia de T/E, para el aislamiento de las células epiteliales, y en un segundo paso, los restos tisulares, supuestamente estromales, fueron recogidos para la disociación de las células fibroblásticas mediante la acción de la colagenasa.

A partir de este protocolo, fue desarrollada una nueva técnica para la obtención de suspensiones de células estromales y epiteliales por separado a partir de una misma biopsia de tejido limbar. Este método de digestión, el Pinv, consistió básicamente en

una inversión del orden de actuación de las enzimas utilizadas en el Pest. De este modo, en primer lugar, la muestra tisular fue incubada en contacto con una solución de colagenasa y, posteriormente, los restos tisulares fueron sometidos a un segundo paso de digestión mediante su incubación con una mezcla de T/E.

Ambos protocolos de digestión han demostrado llevar a la obtención de un rendimiento celular similar en cuanto a número total de células (epiteliales y estromales) aisladas a partir de la muestra de tejido. Además, no han aparecido diferencias significativas en cuanto a la viabilidad de las células aisladas.

Sin embargo, el número de células obtenidas tras la actuación de las enzimas de manera independiente era diferente en función del tipo de protocolo utilizado. En el caso del Pest, la tripsina conseguía aislar un menor número de células que el paso posterior de digestión con la colagenasa. En el Pinv sucedía justo al contrario, es decir, la colagenasa llevaba a la obtención de suspensiones celulares con menor número de células que el paso posterior de tripsinización. Por lo tanto, parece ser que el orden de actuación de las enzimas influye de algún modo en su capacidad de disgregación del tejido, de forma que el hecho de que la segunda enzima sólo tenga que actuar sobre un componente (puesto que la primera enzima ya disgregó el otro) hará aumentar su rendimiento y así, se observa claramente como el Pest obtiene un mayor número de células estromales y el Pinv consigue un número marcadamente superior de células epiteliales.

Básicamente, la acción de la colagenasa consiste en una disgregación de la matriz colágena del estroma limbar, favoreciendo así la separación de los fibroblastos que se encuentran dispersos en él. Por otra parte, la acción de las soluciones de T/E favorece la individualización de las células que constituyen la región epitelial, ya que actúan principalmente alterando las uniones intercelulares. Esto, sumado al hecho de los diferentes rendimientos celulares obtenidos tras los pasos de tripsinización e incubación con colagenasa de los protocolos Pinv y Pest, lleva a la idea de que en uno de estos protocolos la individualización de las poblaciones estromal y epitelial no se producía de manera adecuada. Teniendo en cuenta tanto la composición histológica del tejido limbar, así como resultados previos publicados acerca de los rendimientos celulares obtenidos a partir de la disgregación de muestras de tejido estromal de la

córnea<sup>205</sup>, parece ser que los resultados, en cuanto a número de células aisladas utilizando la colagenasa o la T/E, obtenidos mediante el Pinv son los más coherentes, ya que el número de las células epiteliales y estromales obtenidas parece correlacionarse mucho más con el contenido de ambos tipos celulares en el tejido nativo, que las obtenidas siguiendo el Pest.

Por todo esto, parece ser que la disgregación previa del componente estromal, favorece de alguna forma la posterior individualización de las células que constituyen el epitelio limbar. Y además, se podría hipotetizar que la actuación en primer lugar de la T/E en el Pest, sin contar con una disgregación estromal previa (como sucede en el Pinv) no logra sacar todas las células epiteliales limbares, corriendo el riesgo de no llegar a las células más basales, que serían precisamente entre las que encuentran las CMEL.

Aun no apareciendo diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular de las suspensiones celulares obtenidas a partir de ambos protocolos, el porcentaje de cultivos exitosos obtenidos fue significativamente menor en el caso de las células aisladas mediante el Pest.

Todo esto apoya el hecho de que el Pinv parece mejorar los rendimientos de células epiteliales y estromales obtenidas de una muestra de tejido limbar, así como las tasas de establecimiento de cultivos viables, en relación a los obtenidos mediante el Pest.

Las células aisladas y cultivadas sobre superficies plásticas, tanto estromales como epiteliales, han mostrado una buena tasa de expansión, independientemente del protocolo de digestión utilizado. Sin embargo, el hecho de la diferencia en cuanto a la capacidad de establecimiento de los cultivos primarios, nos ha llevado a definir al Pinv como la técnica de elección para la obtención de suspensiones celulares a partir del tejido limbar porcino. Por ello, los estudios de caracterización celular, así como la construcción de los GFF y GFCL han sido llevados a cabo con las poblaciones celulares expandidas a partir de las suspensiones celulares obtenidas mediante la utilización del Pinv.

### **3.- CARACTERIZACION CELULAR**

Los estudios de inmunofluorescencia, desarrollados sobre las células expandidas bajo las condiciones de cultivo definidas, confirmaron la hipótesis establecida de que las células aisladas mediante el tratamiento de las muestras de tejido limbar con T/E presentaban una naturaleza epitelial, siendo dichas poblaciones celulares positivas para el marcador específico de células epiteliales, la pan-citoqueratina. Por otro lado, la ausencia de expresión de dicho marcador por parte de las células recuperadas mediante la digestión con colagenasa confirmaba su origen estromal. La no disponibilidad de anticuerpos reactivos en cerdo frente a antígenos como el FSP1 (proteína de superficie de fibroblastos), la MAPB1 (proteína asociada a los microtúbulos), el CD34 o el AS02 (CD90), característicos de células fibroblásticas, imposibilitó la realización de un fenotipado más concreto de este tipo celular.

Las citoqueratinas, microfilamentos intermedios constituyentes del citoesqueleto de las células epiteliales, comprenden 30 proteínas diferentes específicas de linaje celular<sup>206</sup>. Existe un patrón de expresión diferencial de estas citoqueratinas en los diferentes epitelios que constituyen la superficie ocular, presentando cada uno de ellos un perfil de citoqueratinas característico en función de si se trata de epitelio corneal, limbar o conjuntival<sup>1-3</sup>. En este estudio, se ha utilizado un anticuerpo frente a la pancitoqueratina, que reconoce de manera genérica todas las células epiteliales que se encuentran expresando este tipo de proteína, sin diferenciar entre la expresión de tipos de citoqueratina concretos, debido a la necesidad de establecer diferencias entre la naturaleza estromal y epitelial de las poblaciones celulares expandidas ex vivo.

El mantenimiento de ciertas características propias de ambas poblaciones celulares durante su expansión bajo condiciones in vitro, como por ejemplo el establecimiento de adhesiones y la expresión de determinadas proteínas asociadas a un estado de diferenciación determinado, también fue definido mediante estudios de expresión proteica por inmunofluorescencia.

En el tejido limbar porcino y bajo condiciones normales, tanto las células estromales como las células que constituyen el epitelio limbar mostraban reactividad frente a los anticuerpos utilizados para la detección de la expresión de la ALDH1A1,  $\alpha$ -SMA,

colágeno de tipo II, integrina  $\beta 1$  y Cx43. Sin embargo, la desmoplaquina básicamente aparecía expresada a nivel epitelial, en las zonas de contacto intercelular.

En las células en cultivo, las poblaciones epitelial y estromal, mostraban una clara expresión de todos esos marcadores, aunque siguiendo, para alguno de ellos, diferentes patrones en función del tipo celular o del pase de los cultivos.

Estudios previos en humanos han demostrado la expresión por parte de las células del epitelio y los queratocitos de la córnea de una serie de proteínas hidrosolubles que poseen cierta actividad enzimática, como la ALDH1A1<sup>207-209</sup>. Este tipo de proteínas se han definido como cristalinas corneales, y parece que su actividad está relacionada con el mantenimiento de la transparencia tisular y la protección frente a posibles efectos dañinos producidos por la peroxidación lipídica inducida por la luz ultravioleta, interviniendo en los procesos de destoxificación<sup>210-212</sup>. Por otra parte, la expresión de esta proteína a nivel de epitelio y estroma corneal porcino ha sido descrita previamente<sup>4</sup>.

Además en modelos de cultivo de queratocitos corneales, se ha descrito que la transformación de este tipo celular hacia un fenotipo de reparación, fibroblástico o miofibroblástico, conlleva la pérdida de expresión de las cristalinas corneales<sup>213</sup>.

Tanto las células epiteliales como las derivadas del estroma bajo las condiciones de cultivo in vitro establecidas demostraron el mantenimiento de la expresión de la ALDH1A1 durante el P0. A su vez, las células estromales mostraron una mayor intensidad de fluorescencia para este marcador durante el P1.

En relación a los resultados obtenidos en los cortes de la región limbar, tanto las células epiteliales como las células estromales en cultivo expresaban colágeno de tipo II. Esta expresión, en el caso de las células estromales en P1 aparecía asociada a una mayor intensidad de fluorescencia, lo que lleva a pensar que no sólo la actividad sintética de estas células se ve mantenida bajo las condiciones de cultivo sino que se incrementa tras el primer subcultivo. Esta expresión de colágeno por parte de las células estromales es muy importante, puesto que esta proteína representa el componente mayoritario de la matriz extracelular entre la que este tipo celular se encuentra disperso en el tejido original<sup>214;215</sup>.

El anticuerpo utilizado para la detección de expresión de la  $\alpha$ -SMA demostró, tanto en las secciones de tejido limbar como en las poblaciones celulares epitelial y estromal, reactividad frente a los microfilamentos de actina integrantes del citoesqueleto celular.

En las células de fenotipo miofibroblástico, es típica la aparición de fibras de estrés de  $\alpha$ -SMA en el interior del citoplasma, que aparecen como filamentos prominentes bien definidos que terminan en los bordes celulares a modo de complejas adhesiones focales<sup>216;217</sup>. Una pequeña proporción de la población de células de naturaleza estromal cultivadas en P1 mostraba la expresión de estas fibras de estrés  $\alpha$ -SMA positivas.

Es bien conocido que las condiciones de cultivo que implican concentraciones de suero elevadas o bajas densidades de siembra, llevan a las células de naturaleza fibroblástica a la adquisición de un fenotipo de miofibroblasto<sup>218;219</sup>. Parece ser que las condiciones establecidas en este caso para la expansión de las células aisladas del estroma limbar, en cierta medida provocaban que parte de la población sufriera estos procesos de desdiferenciación. Sin embargo, la baja proporción de células que en P1 mostraban fibras de estrés de  $\alpha$ -SMA apoya la idea de que la mayor parte de la población celular cultivada era capaz de mantener su fenotipo fibroblástico característico.

Esta idea también está apoyada por los resultados obtenidos en los estudios de expresión del marcador Cx43. Este tipo de proteínas, las conexinas, constituyen uniones de tipo "gap" entre las células, conformando una serie de canales entre las membranas plasmáticas de células adyacentes permitiendo la comunicación directa de sus citoplasmas, y por tanto la libre difusión de pequeñas moléculas como iones (calcio y potasio) y segundos mensajeros (cAMP, IP3)<sup>220-222</sup>. Estas proteínas, además, parecen jugar un papel importante en el control de mecanismos de proliferación, diferenciación y regeneración celular<sup>223</sup>.

En el tejido limbar porcino, la expresión de Cx43 aparecía tanto en las regiones estromal como epitelial. En esta última, a nivel basal, al contrario de lo que sucede en el humano, la expresión era homogénea. Esta es una diferencia importante con respecto al limbo humano, puesto que en él la expresión de la Cx43 se localiza en las regiones intermedias y basales, aunque no está expresada por las LSCs, considerándose su negatividad como signo de fenotipo de LESC<sup>224</sup>. A nivel estromal, la

Cx43 aparecía de manera generalizada en todas las células, siguiendo un patrón punteado.

En las células epiteliales en P0, se observó una expresión intensa de Cx43 en los bordes celulares, definiendo los límites entre células adyacentes. En la población fibroblástica, el marcaje para esta proteína, aparecía levemente a nivel citoplasmático acompañado de un patrón de expresión punteado más intenso, tanto en P0 como en P1. A este respecto, se ha definido con anterioridad que en células de fenotipo fibroblástico éste es el patrón de expresión característico para esta proteína, mientras que en los miofibroblastos el marcaje para la Cx43 aparece mayoritariamente a nivel citoplasmático, no existiendo el punteado anteriormente mencionado<sup>225;226</sup>. Estos resultados en los fibroblastos de P0 y P1, apoyan aún más la idea del mantenimiento del fenotipo fibroblástico por parte de las células aisladas del estroma limbar durante la expansión ex vivo.

Otras proteínas estudiadas relacionadas con los mecanismos de adhesión celular, fueron la integrina  $\beta 1$  y la desmoplaquina. La primera está implicada en el establecimiento de uniones célula-célula y de las células a la matriz extracelular<sup>227;228</sup>. Las integrinas son proteínas transmembrana que constituyen estructuras heterodiméricas constituidas por una subunidad  $\beta$  y otra  $\alpha$ , que actúan básicamente como receptores de unión a ligandos específicos<sup>229</sup>. Por lo general, las formas monoméricas aparecen expresadas a nivel citoplasmático, mientras que en la membrana plasmática estas proteínas aparecen en forma dimérica. En la superficie ocular humana la integrina  $\beta 1$  aparece de manera genérica tanto en el citoplasma como en el estroma, siendo en este último el único tipo de subunidad  $\beta$  descrito<sup>230;231</sup>. En la región limbar del cerdo, aparece del mismo modo, expresándose de manera homogénea tanto a nivel epitelial como estromal, regulando básicamente la unión intercelular a nivel epitelial y la adhesión de las células fibroblásticas a las proteínas de la matriz extracelular a nivel estromal.

En las células en cultivo, la expresión de éste marcador se mantenía tanto en la población epitelial en P0 como en la estromal en P0 y P1. En estas últimas, el marcaje aparecía básicamente a nivel citoplasmático, indicando la existencia de la proteína en forma monomérica. En la población de células epiteliales, aparecía una fluorescencia

algo más intensa a nivel de los límites intercelulares, indicando la existencia de esta proteína formando parte de receptores diméricos en la membrana plasmática.

La proteína de adhesión, desmoplaquina, representa uno de los elementos constituyentes de las uniones intercelulares de tipo desmosoma<sup>232</sup>. Este tipo de unión intercelular aparecía extensamente expresado en la fracción epitelial del tejido limbar, siendo más evidente en las capas de células más superficiales y basales. A nivel estromal, su expresión era pobre o nula, esto es debido a que las células fibroblásticas básicamente se unen a la matriz extracelular mediante uniones de tipo hemidesmosoma, no constituidos por este tipo de proteínas<sup>232</sup>.

En las células epiteliales cultivadas, la desmoplaquina aparecía claramente definiendo los límites entre células adyacentes, revelando la existencia de uniones intercelulares de tipo desmosoma en las células cultivadas. En el caso de los fibroblastos procedentes de P0 y P1, el patrón de expresión para esta proteína era totalmente distinto, apareciendo de manera generalizada a nivel citoplasmático. Aunque las uniones de tipo desmosoma no son características de tipos celulares de naturaleza mesenquimal, la expresión de desmoplaquina ha sido descrita previamente en odontoblastos<sup>233</sup> y células del ligamento periodontal<sup>234</sup>, lo cual no implica que conformen estructuras de adhesión de tipo desmosoma, como en las células epiteliales, sino que son capaces de producir este tipo de proteínas, que en estos tipos celulares se unen a la vimentina del citoesqueleto celular. Esto explicaría el patrón de fluorescencia obtenido para este marcador en las células de naturaleza fibroblástica aisladas del estroma limbar.

#### **4.- ENSAYOS DE MULTIPOTENCIALIDAD**

Con el fin de establecer la capacidad de adquisición de otros fenotipos propios de tipos celulares del linaje mesenquimal de las células aisladas del estroma limbar, se llevaron a cabo ensayos de inducción de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.

Los cultivos celulares mantenidos bajo las condiciones de cultivo específicas, mostraron una capacidad evidente de adquisición de fenotipos del linaje de células óseas y adiposas, siendo positivos los estudios de mineralización y expresión de vesículas

lipídicas, respectivamente. En el caso de la diferenciación hacia fenotipo propio de células de cartílago, los resultados fueron ambiguos. Sí se observó una tinción con azul alcian más intensa en el caso de las células inducidas que en las control, sin embargo dicha intensidad podría estar más asociada a la mayor densidad celular en el momento de la tinción, que realmente a la expresión de proteoglicanos propia de las células de fenotipo de condrocito. En los estudios previamente publicados con respecto a la existencia de CMM en el estroma tanto limbar como corneal, no se detalla la realización de estos ensayos de diferenciación condrogénica, por lo que no se pueden establecer comparaciones<sup>13;73-75;235</sup>. Por otra parte, este tipo de ensayos de inducción de diferenciación hacia un fenotipo de células propias del cartílago, es bastante controvertido, puesto que en la mayor parte de la bibliografía se discute acerca de su eficacia.

Estos estudios permiten concluir que las células aisladas del estroma limbar porcino parecen tener características de CMM.

## **5.- SUSTITUTIVOS**

Una vez confirmada la naturaleza y características fenotípicas de las poblaciones celulares aisladas, ambos tipos celulares expandidos in vitro fueron utilizados para la construcción de los GFF y GFCL.

Los geles de fibrina han sido ampliamente utilizados como andamiajes tridimensionales en ingeniería tisular, debido a que poseen importantes características en cuanto a biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que hace de estos biopolímeros un soporte ideal para el implante de diferentes tipos celulares. Además su gran disponibilidad y fácil procesamiento permiten poder llevar a cabo métodos de ingeniería tisular accesibles y, lo más importante, totalmente autólogos<sup>169</sup>.

La experiencia previa con los andamiajes de fibrina en ingeniería tisular del cartílago<sup>236;237</sup> y de la piel<sup>203;238</sup> ha demostrado la posibilidad de obtener equivalentes tisulares que contienen tipos celulares específicos. Además el hecho ya demostrado de que este tipo de soportes permite la expansión de las células del epitelio limbar, tanto en su superficie como en su interior, así como de queratocitos procedentes del estroma

corneal, ha llevado a que consideremos este tipo de andamiajes como el ideal para la construcción de los equivalentes de tejido limbar y así, Rama y colaboradores<sup>124</sup> describieron la reparación de la superficie corneal en pacientes con SIL utilizando células de epitelio limbar, exclusivamente, embebidas en geles de fibrina. Más recientemente, Alaminos y colaboradores<sup>170</sup> consiguieron la construcción de un equivalente corneal mediante el cultivo de células del estroma corneal en el interior de un gel de fibrina-agarosa, en conejo.

El nuevo GFCL que describimos en este estudio fue construido utilizando células epiteliales y estromales que, al contrario que en otros tejidos oculares "ingenierizados", fueron aisladas de la región limbar. Esto es importante por el hecho de que las interacciones epitelio-mesenquimales parecen ser necesarias para mantener un adecuado comportamiento celular.

Se conoce bien que el plasma sanguíneo contiene no sólo fibrinógeno, sino también citoquinas, factores de crecimiento, fibronectina y otras moléculas de adhesión que pueden promover la capacidad proliferativa de los fibroblastos<sup>239</sup>.

Las condiciones establecidas para la elaboración de los geles de fibrina, en cuanto a concentración de ácido tranexámico, cloruro cálcico y la utilización de MCF, han llevado a conseguir estructuras de fibrina con la consistencia adecuada para su posterior manipulación, permitiendo a su vez la correcta expansión de los dos tipos celulares utilizados para la construcción final de los GFCL.

Las células fibroblásticas cultivadas en geles de fibrina, para constituir el GFF, mostraban una buena tasa de proliferación, y eran capaces de dispersarse a lo largo de toda esta estructura tridimensional, mostrando sus procesos citoplasmáticos característicos y estableciendo una red interconectada como revelan las imágenes de MEB y de histología clásica.

Aunque tras 14 días de cultivo se apreció una ligera disminución del diámetro de los GFF con respecto a su diámetro inicial, probablemente asociada al crecimiento de las células fibroblásticas embebidas en su interior, ésta contracción no fue tan notable como en el caso de la descrita en otras matrices como los geles derivados de colágeno  
170;195;240

Cuando se cultivaron células del epitelio limbar sobre los GFF para desarrollar los GFCL, se pudo observar una lámina confluyente de células sobre la superficie del constructo tras 14 y 21 días de cultivo. Este crecimiento celular fue verificado por MEB y microscopia óptica.

La estructura de dichos GFCL, fue analizada a partir de secciones transversales de los constructos teñidos con hematoxilina-eosina. Estos estudios demostraron la correcta dispersión de las células fibroblásticas en el interior de los geles, mientras que a los 14 y 21 días de cultivo se podía observar en la superficie de los mismos una capa de células de epiteliales que había sufrido procesos de estratificación. Si se comparaban estas secciones con las obtenidas a partir de la región limbar o de la córnea central del cerdo, la densidad de células fibroblásticas aparentemente no era muy diferente a la que puede aparecer en los estromas limbar y corneal en el tejido nativo, mientras que la estructura epitelial conformada sobre los GFCL aparecía algo más desorganizada y menos estratificada. Esta menor estratificación, probablemente se deba a que los cultivos de los GFCL fueron mantenidos durante todo el período de cultivo sumergidos en medio de cultivo, no habiendo sometido a estas estructuras a una interfase aire-líquido, lo que probablemente habría resultado en una mayor estratificación de la película epitelial.

En dichas secciones histológicas tampoco se pudo apreciar la formación de una membrana basal en la interfase de los GFF y la lámina epitelial suprayacente. Lo que probablemente indica que la formación de dicha membrana precisa de un mayor período de mantenimiento de estos GFCL bajo condiciones de cultivo in vitro.

Los posibles cambios en cuanto a la composición proteica del andamiaje de fibrina durante el período de cultivo de los GFCL, fueron estudiados mediante técnicas de histología básicas. En las secciones de tejido nativo, tanto de córnea como del limbo, mediante la tinción de azul alcian se pudo observar la existencia a nivel estromal de un gran contenido de proteoglicanos, así como a nivel epitelial en las capas más basales y superficiales. En los GFCL, el patrón de tinción para los proteoglicanos aparecía fuertemente expresado a nivel epitelial tras 14 días de cultivo. Tras 21 días, la existencia de proteoglicanos en la capa de células expandidas sobre el GFCL, aparecía, al igual que en las secciones del tejido nativo, más intensa en la capa más superficial y

la más basal, que se encontraba en contacto directo con el GFF. A nivel de éste último, no se apreciaba en ninguna de las muestras una tinción para los proteoglicanos tan fuerte como la que aparece en el tejido nativo, dando a entender que las células fibroblásticas contenidas en su interior no habían tenido tiempo suficiente para la producción de este tipo de moléculas constituyentes de la matriz extracelular.

Las secciones de los GFCL teñidas con tinción elástica de van Gieson, demostraban la existencia de colágeno a nivel epitelial a los 14 y 21 días. En la región del GFF, se podía observar una tinción ligeramente más intensa a los 21 días de cultivo, lo que podría indicar la producción de colágeno por parte de los fibroblastos incluidos en el gel de fibrina. Si se comparan con las secciones de tejido limbar y corneal, en éstas, la existencia de colágeno a nivel estromal era mucho mayor, y a nivel epitelial existía una expresión homogénea algo más débil de esta proteína, lo que se correlaciona con los estudios de inmunofluorescencia realizados en las secciones de tejido limbar porcino utilizando un anticuerpo frente al colágeno de tipo II.

La consistencia de los GFCL tras 21 días de cultivo era suficiente como para permitir su recuperación del recipiente de cultivo y su manipulación, lo que convierte a estos sustitutivos tisulares en un apósito, que a modo de membrana, pueda ser trasplantado para el posible tratamiento del SIL.

En resumen, el diseño de este tipo de equivalentes de tejido limbar representa una interesante novedad en el campo de la bioingeniería de la superficie ocular, ya que hasta el momento, las aplicaciones de la ingeniería de tejidos descritas en este campo, se centran únicamente en el desarrollo de sustitutivos corneales. Por otra parte, la idea de reconstruir in vitro la anatomía y funciones del tejido limbar, representa una importante alternativa a todas las técnicas de expansión in vitro de las LESC que están enfocadas, básicamente, a la búsqueda de soportes, como la membrana amniótica, la fibrina, el cristalino, las lentes de contacto o los geles de colágeno, para facilitar la proliferación y posterior trasplante de ese tipo celular concreto. Y así, creemos que es muy interesante la posibilidad de reemplazar no sólo la población de LESC ausente o dañada, sino toda la anatomía del tejido limbar, la cual parece ser de gran importancia para la correcta funcionalidad de este tipo tisular.

## **VI.- CONCLUSIONES**

## **VI.- CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir:

### **1. En relación a los protocolos de digestión:**

- Las enzimas utilizadas en los protocolos de digestión Pest y Pinv (T/E y colagenasa de tipo I), empleados para el aislamiento e individualización de los dos principales componentes celulares que constituyen el tejido limbar (epitelial y estromal), dan lugar a rendimientos celulares diferentes en función de su orden actuación. Así, es en ambos protocolos la enzima que actúa en segundo lugar la que genera un mayor rendimiento celular.
- En el Pinv, la incubación de las muestras tisulares con soluciones de T/E da lugar al aislamiento de un mayor número de células que el Pest. Esto parece indicar que la disgregación previa del estroma limbar favorece de alguna forma la posterior individualización de las células que constituyen el epitelio limbar.
- Aún no existiendo diferencias considerables en cuanto a la viabilidad celular de las suspensiones celulares obtenidas a partir de ambos protocolos de digestión (Pest y Pinv) el porcentaje de cultivos exitosos establecidos es mayor en el caso del Pinv.
- A partir de una pequeña muestra de tejido limbar, el nuevo Pinv, ofrece la posibilidad de obtener suspensiones de células estromales y epiteliales viables y de manera independiente, para su posterior expansión ex vivo.

### **2. En relación a los cultivos celulares de las poblaciones epitelial y estromal aisladas de las muestras de tejido limbar**

- Las condiciones de cultivo establecidas para llevar a cabo la expansión ex vivo de las células aisladas a partir del tejido limbar, permiten una correcta proliferación de las poblaciones de células epiteliales y estromales llevando, al final de un período de unos 14 días, a la obtención de un número de células suficientes como para poder construir los sustitutos limbares.

### **3. En relación a la identificación fenotípica de las poblaciones celulares cultivadas**

- La expresión por parte de las células en cultivo de los marcadores proteicos estudiados, permite establecer la naturaleza epitelial y fibroblástica de las células cultivadas. Además, a partir de estos estudios se ha podido establecer el mantenimiento de determinados mecanismos de adhesión y síntesis proteica por parte de las células bajo las condiciones de cultivo in vitro establecidas, que se expresan de manera característica en el tejido nativo.
- La población de células de morfología fibroblástica aisladas del estroma limbar, ha demostrado la capacidad de adquirir un fenotipo de células propias de tejido óseo y adiposo, revelando así su multipotencialidad, y por tanto expresando propiedades asociadas a las CMM.

### **4. En relación a los sustitutos**

- La composición definida de los geles de fibrina, permite la adhesión y expansión de manera tridimensional de las células de naturaleza mesenquimal, permitiendo la construcción de los sustitutos estromales, los GFF.

- La población epitelial sembrada sobre los GFF es capaz de adherirse y proliferar, mostrando signos de estratificación bajo las condiciones de cultivo establecidas, y, por tanto, llevando a la constitución final del sustitutivo limbar, el GFCL, tras 14-21 días de cultivo in vitro.
- Los GFCL contruidos, muestran propiedades de elasticidad y resistencia suficientes como para permitir su recuperación y posterior manipulación. A nivel histológico sus características morfológicas se asemejan en cierta medida al tejido nativo. Sin embargo, a nivel del GFF, y tras 21 días de cultivo el entramado de fibrina no fue reemplazado por matriz extracelular neoformada por las células incluidas en su interior.

**5. En este estudio se ha llegado a construir un sustitutivo del tejido limbar porcino de naturaleza totalmente autóloga, mediante técnicas de ingeniería tisular y la combinación de fibrina junto con los dos principales componentes celulares del tejido limbar. La realización de estudios más profundos acerca de las características de los GFCL, así como de las poblaciones celulares contenidas en él, podría aportar una mayor comprensión de los mecanismos encargados del mantenimiento del nicho de las CMEL. Por otra parte, la realización de un estudio experimental que pueda definir la potencial aplicación terapéutica de estos GFCL en casos de SIL, podría llevar a la definición de nuevas estrategias para el tratamiento de patologías de la superficie ocular.**

**RESUMEN**

## RESUMEN

La córnea, transparente y avascular, es un elemento esencial para asegurar una correcta capacidad visual. Su región más anterior, el epitelio, se encuentra sometido a procesos de descamación, que implican la existencia de un mecanismo de renovación y/o reparación que asegure un recambio celular continuo. Dicho mecanismo se produce gracias a la existencia de una población de células madre, las células madre epiteliales del limbo (CMEL), localizadas en la región más basal del limbo esclero-corneal o nicho de las CMEL. En situaciones patológicas en las que la población de las CMEL está ausente o disminuida, este proceso de recambio celular se ve interrumpido, produciéndose lo que se conoce como síndrome de insuficiencia límbica (SIL). Como alternativa terapéutica a este tipo de alteraciones de la superficie ocular, en los últimos años han tomado gran importancia las técnicas de terapia celular que implican el trasplante de CMEL expandidas ex vivo.

En este estudio, se ha definido en el cerdo como animal de experimentación, la construcción de un sustitutivo del tejido limbar de naturaleza autóloga, el GFCL o gel de fibrina que contiene células del limbo, fabricado a partir de plasma y los dos principales componentes celulares del tejido limbar, células epiteliales y fibroblastos estromales. Con el fin de conseguir optimizar la metodología referente al aislamiento de ambos tipos celulares a partir de una única biopsia de tejido limbar porcino, se ha desarrollado un nuevo protocolo de digestión de las biopsias de tejido limbar, el protocolo invertido (Pinv), consistente en la acción combinada de dos enzimas, la colagenasa de tipo I y soluciones de Tripsina/EDTA (T/E).

La naturaleza de las poblaciones celulares aisladas y cultivadas ha sido confirmada mediante estudios de expresión de marcadores proteicos mediante inmunofluorescencia, definiendo a las células epiteliales como pancitoqueratina positivas, mientras que la ausencia de expresión de este tipo de marcador estableció la naturaleza estromal de las poblaciones celulares de morfología fibroblástica. A su vez, el mantenimiento de determinadas características propias de estos tipos celulares durante el período de cultivo in vitro fue determinada mediante el estudio de la expresión de marcadores de diferenciación celular como la ALDH1A1, la  $\alpha$ -SMA, el colágeno de tipo II, la Cx43, la desmolpaquina y la integrina  $\beta$ 1.

Utilizando el Pinv se ha conseguido el aislamiento de manera independiente de las células del estroma y el epitelio del limbo, generando suspensiones celulares viables, que condujeron a un elevado porcentaje de éxito en el establecimiento de cultivos primarios de ambos tipos celulares. Las células cultivadas mantenían un fenotipo característico, expresando los marcadores proteicos estudiados de manera más similar a las células del tejido nativo.

Los GFCL contruidos mostraban una correcta adhesión y proliferación de las células estromales y epiteliales, tanto en su interior como en su superficie, respectivamente, mostrando al final del período de cultivo una resistencia y elasticidad adecuada. Los estudios realizados mediante técnicas de histología convencionales, así como microscopía electrónica de barrido, revelaron una correcta dispersión de las células mesenquimales en el interior de los geles de fibrina, mientras que en la superficie de los GFCL se podía apreciar a los 14 días de cultivo una película de células epiteliales sobre el sustitutivo estromal o gel de fibrina que contiene fibroblastos (GFF), mostrando pequeños signos de estratificación.

En definitiva, se ha podido construir un sustitutivo limbar de naturaleza totalmente autóloga mediante técnicas de ingeniería tisular que combinan la fibrina aislada de muestras de plasma fresco congelado y las células epiteliales y estromales procedentes de una única muestra del tejido limbar. Así, se ha generado un tejido de características histológicas similares al limbo porcino, el cual puede ser de gran utilidad no sólo para el estudio de las interacciones que mantienen el microambiente propio de las CMEL sino también como sustitutivo limbar de posible aplicación terapéutica en el tratamiento de patologías de la superficie ocular que ocasionan ceguera corneal y que tienen en su patogenia un SIL.

**ANEXO I**

## ANEXO I: FUENTES DE MATERIAL

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Acetona	Sigma-Aldrich Química S.A., España	534064
Ácido acético	Sigma-Aldrich Química S.A., España	A9967
Acido ascórbico	Sigma-Aldrich Química S.A., España	A4034
Ácido Tranexámico	Rottapharm, S.L., España	936708.4
Anti-ALDH1A1	Abcam	Ab23375
Anti- $\alpha$ -SMA	Sigma-Aldrich Química S.A., España	A5228
Anti-Colágeno tipo II	Monosan	PSX1060
Anti-Conejo conjugado con Alexa Fluor 488	Invitrogen S.A., España	A21202
Anti-Conexina 43	Sigma-Aldrich Química S.A., España	C6219
Anti-Desmoplaquina	Serotec	AHP320
Anti-Integrina Beta1	SCBT	Sc-8976
Anti-pancitoqueratina	Abcam	Ab8086
Anti-Ratón conjugado con Alexa Fluor 488	Invitrogen S.A., España	A21206
Asa de siembra calibrada	Copan Innovation, Italia	059F10
Atropina	B.Braun Medical S.A., Barcelona, España	-
Azul alcian	Sigma-Aldrich Química S.A., España	A3157
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Química S.A., España	T8154
Betadine	Mundipharma AG, Suiza	-
Beta-glicerolfosfato	Sigma-Aldrich Química S.A., España	G9891
Caldo de tioglicolato	MAIM S.L., España	2048

<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
Camara Neubauer	Paul Marienfeld GMBH & Co. KG, Alemania	-
Cámaras de cultivo celulas	Nunc Brand, Alemania	154534
Cassettes de histología	Deltalab S.L., España	554143
Cloruro cálcico	B.Braun Medical S.A., Barcelona, España	-
CNA	Biomérieux, Francia	43071
Colagenasa tipo I	Biochrom AG seromed, Alemania	C 1-22
COS	Biomérieux, Francia	43041
Cubreobjetos de vidrio 24x24	Paul Marienfeld GMBH & Co. KG, Alemania	-
Cubreobjetos de vidrio 24x50	Paul Marienfeld GMBH & Co. KG, Alemania	-
Cuhillas de bisturí curvadas nº 12	Aesculap AG et Co. KG, Alemania	16600517
Dexametasona	Sigma-Aldrich Química S.A., España	D4902
DMEM	Sigma-Aldrich Química S.A., España	D5546
DPX	Sigma-Aldrich Química S.A., España	44581
EGF	Sigma-Aldrich Química S.A., España	E9644
Eosina	Sigma-Aldrich Química S.A., España	HT110216
Etanol 96º	Panreac Química S.A.U., España	121085
Etanol Absoluto	Panreac Química S.A.U., España	121086
Filtro de vacio, 150 cc	Millipore	SCGPU01RE
Filtro de vacio, 250 cc	Millipore	SCGPU02RE
Filtro de vacio, 50 cc	Millipore	SCGP00525

<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
Filtro de vacío, 500 cc	Millipore	SCGPU05RE
Filtro jeringa,	Millipore	SLGP033RS
Formaldehído 4%	Panreac Química S.A.U., España	252931.1211
Glutaraldehído	Sigma-Aldrich Química S.A., España	G5882
Ham's F12	Sigma-Aldrich Química S.A., España	N4888
Hematoxilina de Mayer	Sigma-Aldrich Química S.A., España	51275
Hemocultivos aerobios BacT/ALERT SA	Biomérieux, Francia	259789
Hemocultivos anaerobios BacT/ALERT SN	Biomérieux, Francia	259790
Hematoxilina Alcohólica	Sigma-Aldrich Química S.A., España	HT251
Hematoxilina de Gill #3	Sigma-Aldrich Química S.A., España	GHS316
Hidróxido de Amonio	Sigma-Aldrich Química S.A., España	320145
Indometacina	Sigma-Aldrich Química S.A., España	I7378
Insulina	Sigma-Aldrich Química S.A., España	I0516
Ioduro de propidio	Invitrogen	P3566
Isobutilmetilxantina	Sigma-Aldrich Química S.A., España	I7018
Isoflurano	Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, España	-
Ketamina	Merial Laboratorios S.A., Barcelona, España	-
L-glutamina	PAA Laboratories GmbH, Austria	M11-004
McC3	Oxoid Ltd., UK	1022
Medio de montaje para IF	Vector	H-1000

<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
Metanol	Sigma-Aldrich Química S.A., España	534013
Microtubos 0,5 ml	Deltalab S.L., España	200400
Midazolam	IPS Farma S.L., Madrid España	-
Morpho Save	Ventana Medical Systems	250-010
Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich Química S.A., España	N3020
OCT	Tissue-Tech	PS002
Oil Red O	Sigma-Aldrich Química S.A., España	O0625
Parafina	Deltalab S.L., España	440139
PBS estéril, pH 7.4	Sigma-Aldrich Química S.A., España	P5493
Penicilina/Estreptomina 10x	PAA Laboratories GmbH, Austria	P11-010
Placas de cultivo 35 mm	Corning Incorporated, Francia	430588
Placas multipocillo, 24 pocillos	BD Biosciences, Bélgica	353047
Placas multipocillo, 48 pocillos	BD Biosciences, Bélgica	353078
Placas multipocillo, 6 pocillos	BD Biosciences, Bélgica	353046
Portaobjetos tratados	Menzel-Glaser, Alemania	J3800AMNZ
Propilenglicol	Sigma-Aldrich Química S.A., España	134368
Propofol	Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, España	-
Rojo alizarina	Sigma-Aldrich Química S.A., España	A5533
SCG	Oxoid Ltd., UK	CM0143
Solución de Cloruro férrico	Sigma-Aldrich Química S.A., España	HT252

<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
Solución de Van Gieson	Sigma-Aldrich Química S.A., España	HT254
Suero Bovino fetal	LINU	S0181
Suero de burro	Sigma-Aldrich Química S.A., España	D9663
Suero salino estéril	B.Braun Medical S.A., Barcelona, España	0123
T61	Laboratorios Intervet S.A., Madrid, España	-
Tetróxido de osmio	Sigma-Aldrich Química S.A., España	201030
TGF-Beta1	Sigma-Aldrich Química S.A., España	L3408
Toxina colérica	Gentaur Molecular Products BVBA, Bruselas	44-100
Tripsina / EDTA (0,25% / 0,02%)	PAA Laboratories GmbH, Austria	L11-003
Triton X-100	Sigma-Aldrich Química S.A., España	X100
Tubo de polipropileno de 15 cc	Deltalab S.L., España	429946
Tubo de polipropileno de 50 cc	Deltalab S.L., España	429926
Tubos extracción de sangre	BD Vacutainer Systems, UK	367704
Xileno	Sigma-Aldrich Química S.A., España	534056
Yodo de Weigert	Sigma-Aldrich Química S.A., España	HT253

**ANEXO II**

---

## ANEXO II: PREPARACION DE MEDIOS Y SOLUCIONES

### 1. MEDIOS DE CULTIVO

#### 1.1 Medio de Cultivo Específico para células de naturaleza fibroblástica (MCF)

- DMEM
- Suero bovino fetal al 10%.
- L-Glutamina 2 mM
- Penicilina/estreptomicina 100 UI/100 µg /ml
- Filtrar la solución utilizando un filtro de vacío.

#### 1.2 Medio de específico para células de naturaleza epitelial (MCE)

- DMEM/Ham's F12 (1:1).
- Suero bovino fetal al 5%.
- L-Glutamina 2 mM
- Penicilina/estreptomicina 100 UI/100 µg /ml
- Insulina, 5 mg/ml
- EGF, 10 ng/ml
- Toxina colérica, 100 ng/ml
- Filtrar la solución utilizando un filtro de vacío.

#### 1.3 Medio de inducción adipogénica (MCIA)

- DMEM
- Suero bovino fetal al 10%.
- L-Glutamina 2 mM
- Penicilina/estreptomicina 100 UI/100 µg /ml
- Insulina 10 µg/ml
- Dexametasona 1 µM
- Isobutilmetilxantina 1µM

- Indometacina 200  $\mu$ M
- Filtrar la solución utilizando un filtro de vacío.

#### **1.4 Medio de inducción osteogénica (MCIO)**

- DMEM
- Suero bovino fetal al 10%.
- L-Glutamina 2 mM
- Penicilina/estreptomicina 100 UI/100  $\mu$ g /ml
- Dexametasona 100 nM
- Acido ascórbico 50  $\mu$ g/ml
- Beta-glicerolfosfato 10 mM
- Filtrar la solución utilizando un filtro de vacío.

#### **1.5 Medio de inducción condrogénica (MCIC)**

- DMEM
- Suero bovino fetal al 10%.
- L-Glutamina 2 mM
- Penicilina/estreptomicina 100 UI/100  $\mu$ g /ml
- Insulina 6,25  $\mu$ g/ml
- Acido ascórbico 50  $\mu$ M
- TGF-Beta1 10 ng/ml
- Filtrar la solución utilizando un filtro de vacío.

## **2. SOLUCIONES ENZIMATICAS**

### **2.1 Solución de colagenasa tipo I**

#### **2.1.1 Solución de colagenasa tipo I, 1 mg/ml**

- DMEM
- Penicilina/estreptomina 100 UI/100 µg /ml  
(solución stock 10.000 UI/10.00 µg /ml)
- Colagenasa de tipo I (1mg/ml)
- Filtrar la solución utilizando un filtro de 0.22 µm.

#### **2.1.2 Solución de colagenasa tipo I, 2 mg/ml**

- DMEM
- Penicilina/estreptomina 100 UI/100 µg /ml  
(solución stock 10.000 UI/10.00 µg /ml)
- Colagenasa de tipo I (2mg/ml)
- Filtrar la solución utilizando un filtro de 0.22 µm.

## **3. SOLUCIONES DE TINCION**

### **3.1 Solución de Rojo de alizarina (100 ml)**

- Agua destilada, 100 ml
- Rojo de alizarina, 1 g
- Agitar
- Ajustar el pH a 4.0 utilizando una solución de hidróxido de amonio al 10%.
- Filtrar

### **3.2 Solución de Oil Red O (100 ml)**

- Propilenglicol al 100%, 100 ml
- Oil Red O, 350 mg
- Agitar durante toda la noche
- Filtrar antes de usar

### **3.3 Solución de Azul alcian**

- Acido acético al 3% (100ml), en agua destilada
- Azul alcian 8GX, 1 g
- Ajustar el pH a 2,5, utilizando ácido acético
- Agitar bien y filtrar

### **3.4 Solución de tinción elástica**

- Hematoxilina alcohólica, 20 ml
- Cloruro férrico, 3 ml
- Yodo de Weigert, 8 ml
- Agua destilada, 5ml
- Mezclar bien

### **3.5 Solución de cloruro férrico**

- Cloruro férrico, 3ml
- Agua destilada, 37 ml
- Mezclar bien

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Franke WW, Schmid E, Schiller DL *et al.* Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1982; **46 Pt 1**: 431-53.
2. Kasper M, Moll R, Stosiek P *et al.* Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. *Histochemistry* 1988; **89**: 369-77.
3. Kasper M, Stosiek P, Lane B. Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. *Acta Histochem.* 1992; **93**: 371-81.
4. Jester JV, Budge A, Fisher S *et al.* Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2005; **46**: 2369-78.
5. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog.Retin.Eye Res.* 1999; **18**: 529-51.
6. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR *et al.* The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog.Retin.Eye Res.* 2001; **20**: 625-37.
7. Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr.Opin.Ophthalmol.* 2001; **12**: 237-41.
8. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1982; **80**: 155-71.
9. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1991; **89**: 721-56.
10. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G *et al.* Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989; **57**: 201-9.
11. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J.Cell Biol.* 1986; **103**: 49-62.
12. Dravida S, Pal R, Khanna A *et al.* The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 2005; **160**: 239-51.
13. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL *et al.* Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol.Vis.* 2008; **14**: 431-42.
14. Lavker RM, Dong G, Cheng SZ *et al.* Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm,

- and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991; **32**: 1864-75.
15. Chen Z, de Paiva CS, Luo L *et al.* Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004; **22**: 355-66.
  16. Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ *et al.* Corneal stem cells in review. *Wound. Repair Regen.* 2001; **9**: 483-94.
  17. Dua HS, zuaa-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv. Ophthalmol.* 2000; **44**: 415-25.
  18. Dua HS, zuaa-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* 2000; **84**: 273-8.
  19. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C *et al.* Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001; **20**: 639-73.
  20. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990; **31**: 448-56.
  21. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV *et al.* In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; **34**: 2672-9.
  22. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P *et al.* Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J. Cell Biol.* 1999; **145**: 769-82.
  23. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J. Cell Sci.* 1998; **111 ( Pt 19)**: 2867-75.
  24. Tseng SC, Zhang SH. Limbal epithelium is more resistant to 5-fluorouracil toxicity than corneal epithelium. *Cornea* 1995; **14**: 394-401.
  25. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989; **3 ( Pt 2)**: 141-57.
  26. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; **229**: 560-1.
  27. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1988; **29**: 1533-7.
  28. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T *et al.* Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 2001; **119**: 298-300.

29. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T *et al.* Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; **108**: 1569-74.
30. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD *et al.* Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv.Ophthalmol.* 2007; **52**: 483-502.
31. Wolosin JM, Xiong X, Schutte M *et al.* Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog.Retin.Eye Res.* 2000; **19**: 223-55.
32. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1990; **31**: 1301-14.
33. Chen JJ, Tseng SC. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1991; **32**: 2219-33.
34. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1991; **32**: 96-105.
35. Kruse FE, Chen JJ, Tsai RJ *et al.* Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1990; **31**: 1903-13.
36. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv.Ophthalmol.* 2003; **48**: 631-46.
37. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp.Eye Res.* 2005; **81**: 247-64.
38. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; **98**: 3156-61.
39. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1992; **33**: 143-52.
40. Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye* 1994; **8 ( Pt 2)**: 163-9.
41. Dua HS, Saini JS, zuara-Blanco A *et al.* Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J.Ophthalmol.* 2000; **48**: 83-92.
42. Lavker RM, Sun TT. Epithelial stem cells: the eye provides a vision. *Eye* 2003; **17**: 937-42.
43. Ramaesh K, Dhillon B. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur.J.Ophthalmol.* 2003; **13**: 515-24.
44. Buck RC. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1985; **26**: 1296-9.

45. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 1983; **24**: 1442-3.
46. Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 1981; **21**: 434-41.
47. Beebe DC, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 1996; **37**: 1815-25.
48. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; **88**: 287-98.
49. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; **287**: 1427-30.
50. Schofield R. The stem cell system. *Biomed.Pharmacother.* 1983; **37**: 375-80.
51. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; **116**: 769-78.
52. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2005; **21**: 605-31.
53. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; **311**: 1880-5.
54. Li W, Hayashida Y, Chen YT *et al.* Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007; **17**: 26-36.
55. Baum JL. Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am.J.Ophthalmol.* 1970; **69**: 669-76.
56. Vantrappen L, Geboes K, Missotten L *et al.* Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 1985; **26**: 220-5.
57. Suda T, Arai F, Shimmura S. Regulation of stem cells in the niche. *Cornea* 2005; **24**: S12-S17.
58. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH *et al.* Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 2005; **46**: 497-503.
59. Takayama T, Kondo T, Kobayashi M *et al.* Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea. *Anat.Rec.(Hoboken.)* 2009; **292**: 756-63.
60. Espana EM, Kawakita T, Romano A *et al.* Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 2003; **44**: 5130-5.
61. Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ. Limbal stem cells: the search for a marker. *Clin.Experiment.Ophthalmol.* 2006; **34**: 64-73.

62. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye* 1989; **3 ( Pt 2)**: 132-40.
63. Shanmuganathan VA, Foster T, Kulkarni BB *et al.* Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br.J.Ophthalmol.* 2007; **91**: 514-9.
64. Yeung AM, Schlotzer-Schrehardt U, Kulkarni B *et al.* Limbal epithelial crypt: a model for corneal epithelial maintenance and novel limbal regional variations. *Arch.Ophthalmol.* 2008; **126**: 665-9.
65. Peifer M. Signal transduction. Neither straight nor narrow. *Nature* 1999; **400**: 213-5.
66. Quesenberry PJ, Becker PS. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; **95**: 15155-7.
67. Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J.Cell Physiol* 1995; **163**: 61-79.
68. Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004; **36**: 643-57.
69. Lauweryns B, van den Oord JJ, De VR *et al.* A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1993; **34**: 1983-90.
70. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM *et al.* Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 1402-9.
71. Wiley L, SundarRaj N, Sun TT *et al.* Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1991; **32**: 594-602.
72. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO *et al.* Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br.J.Ophthalmol.* 2005; **89**: 529-32.
73. Funderburgh ML, Du Y, Mann MM *et al.* PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *FASEB J.* 2005; **19**: 1371-3.
74. Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J *et al.* Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2005; **46**: 1653-8.
75. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM *et al.* Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005; **23**: 1266-75.
76. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp.Hematol.* 1976; **4**: 267-74.
77. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000; **18**: 1-9.

78. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br.J.Haematol.* 2000; **109**: 235-42.
79. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der KC *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; **102**: 1548-9.
80. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G *et al.* Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000; **2**: 477-88.
81. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues.Organs* 2003; **174**: 101-9.
82. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; **21**: 105-10.
83. Igura K, Zhang X, Takahashi K *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004; **6**: 543-53.
84. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp.Hematol.* 2000; **28**: 875-84.
85. Le BK, Tammik L, Sundberg B *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand.J.Immunol.* 2003; **57**: 11-20.
86. Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 2001; **15**: 28-37.
87. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; **19**: 180-92.
88. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143-7.
89. Noth U, Osyczka AM, Tuli R *et al.* Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J.Orthop.Res.* 2002; **20**: 1060-9.
90. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* 2002; **13**: 4279-95.
91. Espana EM, Romano AC, Kawakita T *et al.* Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003; **44**: 4275-81.

92. Puangsrichareern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; **102**: 1476-85.
93. Pires RT, Chokshi A, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation or conjunctival limbal autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5-fluorouracil in glaucoma surgeries. *Cornea* 2000; **19**: 284-7.
94. Schwartz GS, Holland EJ. Iatrogenic limbal stem cell deficiency. *Cornea* 1998; **17**: 31-7.
95. Gass JD. The syndrome of keratoconjunctivitis, superficial moniliasis, idiopathic hypoparathyroidism and Addison's disease. *Am.J.Ophthalmol.* 1962; **54**: 660-74.
96. Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y *et al.* Ocular surface abnormalities in aniridia. *Am.J.Ophthalmol.* 1995; **120**: 368-75.
97. Espana EM, Raju VK, Tseng SC. Focal limbal stem cell deficiency corresponding to an iris coloboma. *Br.J.Ophthalmol.* 2002; **86**: 1451-2.
98. Espana EM, Grueterich M, Romano AC *et al.* Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; **109**: 2004-10.
99. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp.Eye Res.* 2004; **78**: 433-46.
100. Holland EJ, Djalilian AR, Schwartz GS. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique. *Ophthalmology* 2003; **110**: 125-30.
101. Clinch TE, Goins KM, Cobo LM. Treatment of contact lens-related ocular surface disorders with autologous conjunctival transplantation. *Ophthalmology* 1992; **99**: 634-8.
102. Gomes JA, Santos MS, Ventura AS *et al.* Amniotic membrane with living related corneal limbal/conjunctival allograft for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Arch.Ophthalmol.* 2003; **121**: 1369-74.
103. Holland EJ, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea* 1996; **15**: 549-56.
104. Holland EJ. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1996; **94**: 677-743.
105. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am.J.Ophthalmol.* 1990; **110**: 646-56.
106. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br.J.Ophthalmol.* 1994; **78**: 401-8.

107. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br.J.Ophthalmol.* 1998; **82**: 1407-11.
108. Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Rev.* 2006; **2**: 247-54.
109. Secker GA, Daniels JT. Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem Cell Rev.* 2008; **4**: 159-68.
110. Calonge M, Diebold Y, Saez V *et al.* Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp.Eye Res.* 2004; **78**: 457-72.
111. Dart J. Impression cytology of the ocular surface--research tool or routine clinical investigation? *Br.J.Ophthalmol.* 1997; **81**: 930.
112. Kobayashi A, Sugiyama K. In vivo corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea* 2005; **24**: 435-7.
113. Herman WK, Doughman DJ, Lindstrom RL. Conjunctival autograft transplantation for unilateral ocular surface diseases. *Ophthalmology* 1983; **90**: 1121-6.
114. Thoft RA. Conjunctival transplantation. *Arch.Ophthalmol.* 1977; **95**: 1425-7.
115. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; **96**: 709-22.
116. Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M *et al.* Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* 1991; **98**: 438-45.
117. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; **349**: 990-3.
118. Spelsberg H, Sundmacher R. [Significance of immediate affixation of a hard contact lens in the emergency treatment of severe alkali burns of the cornea (case report)]. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 2005; **222**: 905-9.
119. Poon AC, Geerling G, Dart JK *et al.* Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br.J.Ophthalmol.* 2001; **85**: 1188-97.
120. Anderson DF, Ellies P, Pires RT *et al.* Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br.J.Ophthalmol.* 2001; **85**: 567-75.
121. Gomes JA, Dos Santos MS, Cunha MC *et al.* Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. *Ophthalmology* 2003; **110**: 466-73.
122. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK *et al.* Amniotic membrane transplantation for reconstruction of corneal epithelial surface in cases of partial limbal stem cell deficiency. *Indian J.Ophthalmol.* 2004; **52**: 281-5.

123. Espana EM, Di PM, Grueterich M *et al.* Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* 2004; **18**: 406-17.
124. Rama P, Bonini S, Lambiase A *et al.* Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001; **72**: 1478-85.
125. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; **109**: 1278-84.
126. Solomon A, Ellies P, Anderson DF *et al.* Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; **109**: 1159-66.
127. Daya SM, Ilari FA. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2001; **108**: 126-33.
128. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL *et al.* Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am.J.Ophthalmol.* 2005; **140**: 223-30.
129. Tsubota K, Shimmura S, Shinozaki N *et al.* Clinical application of living-related conjunctival-limbal allograft. *Am.J.Ophthalmol.* 2002; **133**: 134-5.
130. Reinhard T, Sundmacher R, Spelsberg H *et al.* Homologous penetrating central limbo-keratoplasty (HPCLK) in bilateral limbal stem cell insufficiency. *Acta Ophthalmol.Scand.* 1999; **77**: 663-7.
131. Reinhard T, Spelsberg H, Henke L *et al.* Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2004; **111**: 775-82.
132. Spelsberg H, Reinhard T, Henke L *et al.* Penetrating limbo-keratoplasty for granular and lattice corneal dystrophy: survival of donor limbal stem cells and intermediate-term clinical results. *Ophthalmology* 2004; **111**: 1528-33.
133. Jenkins C, Tuft S, Liu C *et al.* Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye* 1993; **7 ( Pt 5)**: 629-33.
134. Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994; **13**: 389-400.
135. Tsubota K, Toda I, Saito H *et al.* Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995; **102**: 1486-96.
136. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br.J.Ophthalmol.* 1998; **82**: 235-40.

137. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N.Engl.J.Med.* 2000; **343**: 86-93.
138. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K *et al.* Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch.Ophthalmol.* 1998; **116**: 431-41.
139. Tsubota K, Satake Y, Kaido M *et al.* Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1999; **340**: 1697-703.
140. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N *et al.* Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am.J.Ophthalmol.* 2006; **141**: 267-75.
141. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ *et al.* The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003; **44**: 106-16.
142. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C *et al.* Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br.J.Ophthalmol.* 2004; **88**: 1280-4.
143. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y *et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N.Engl.J.Med.* 2004; **351**: 1187-96.
144. Collin C, Ouhayoun JP, Grund C *et al.* Suprabasal marker proteins distinguishing keratinizing squamous epithelia: cytokeratin 2 polypeptides of oral masticatory epithelium and epidermis are different. *Differentiation* 1992; **51**: 137-48.
145. Juhl M, Reibel J, Stoltze K. Immunohistochemical distribution of keratin proteins in clinically healthy human gingival epithelia. *Scand.J.Dent.Res.* 1989; **97**: 159-70.
146. Kim MK, Lee JL, Oh JY *et al.* Efficient cultivation conditions for human limbal epithelial cells. *J.Korean Med.Sci.* 2008; **23**: 864-9.
147. Daya SM, Watson A, Sharpe JR *et al.* Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005; **112**: 470-7.
148. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C *et al.* Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 2006; **113**: 1765-72.
149. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1999; **97**: 891-986.
150. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye* 1989; **3 ( Pt 2)**: 132-40.

151. Gipson IK, Grill SM. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1982; **23**: 269-73.
152. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; **6**: 331-43.
153. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ *et al.* Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000; **19**: 65-71.
154. Shimazaki J, Aiba M, Goto E *et al.* Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; **109**: 1285-90.
155. Han B, Schwab IR, Madsen TK *et al.* A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea* 2002; **21**: 505-10.
156. 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.
157. Galal A, Perez-Santonja JJ, Rodriguez-Prats JL *et al.* Human anterior lens capsule as a biologic substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells in ocular surface reconstruction. *Cornea* 2007; **26**: 473-8.
158. Di GN, Bosch M, Zamora K *et al.* A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009; **87**: 1571-8.
159. Gruber HE, Leslie K, Ingram J *et al.* Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: in vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers. *Spine J.* 2004; **4**: 44-55.
160. Leo AJ, Grande DA. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Cells Tissues. Organs* 2006; **183**: 112-22.
161. Ringe J, Kaps C, Burmester GR *et al.* Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002; **89**: 338-51.
162. Song L, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytotherapy.* 2004; **6**: 596-601.
163. Whang K, Tsai DC, Nam EK *et al.* Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; **42**: 491-9.
164. Lanza RP, Jackson R, Sullivan A *et al.* Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* 1999; **67**: 1105-11.

165. Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis.Cartilage*. 2004; **12**: 117-30.
166. Risbud MV, Sittinger M. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol*. 2002; **20**: 351-6.
167. Rosso F, Marino G, Giordano A *et al*. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J.Cell Physiol* 2005; **203**: 465-70.
168. Ng KW, Khor HL, Hutmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2004; **25**: 2807-18.
169. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008; **14**: 199-215.
170. Alaminos M, Del CS-Q, Munoz-Avila JI *et al*. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci*. 2006; **47**: 3311-7.
171. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 2001; **936**: 11-30.
172. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW *et al*. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002; **100**: 743-54.
173. Blomback B, Carlsson K, Hessel B *et al*. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim.Biophys.Acta* 1989; **997**: 96-110.
174. Naito M, Nomura H, Iguchi A. Migration of cultured vascular smooth muscle cells into non-crosslinked fibrin gels. *Thromb.Res*. 1996; **84**: 129-36.
175. Watanabe K, Tanaka K. Influence of fibrin, fibrinogen and fibrinogen degradation products on cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 1983; **48**: 57-70.
176. Sierra DH, Eberhardt AW, Lemons JE. Failure characteristics of multiple-component fibrin-based adhesives. *J.Biomed.Mater.Res*. 2002; **59**: 1-11.
177. Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM *et al*. TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J.Cell Physiol* 1997; **170**: 69-80.
178. Coustry F, Gillery P, Maquart FX *et al*. Effect of transforming growth factor beta on fibroblasts in three-dimensional lattice cultures. *FEBS Lett*. 1990; **262**: 339-41.

179. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J.Biomed.Mater.Res.* 2002; **60**: 607-12.
180. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. A fibrin-based arterial media equivalent. *J.Biomed.Mater.Res.A* 2003; **66**: 550-61.
181. Herbert CB, Bittner GD, Hubbell JA. Effects of fibrinolysis on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in two- and three-dimensional fibrin gels. *J.Comp Neurol.* 1996; **365**: 380-91.
182. Tuan TL, Grinnell F. Fibronectin and fibrinolysis are not required for fibrin gel contraction by human skin fibroblasts. *J.Cell Physiol* 1989; **140**: 577-83.
183. Auxenfans C, Builles N, Andre V *et al.* [Porous matrix and primary-cell culture: a shared concept for skin and cornea tissue engineering]. *Pathol.Biol.(Paris)* 2009; **57**: 290-8.
184. Carrier P, Deschambeault A, Talbot M *et al.* Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2008; **49**: 1376-85.
185. Carrier P, Deschambeault A, Audet C *et al.* Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2009; **50**: 2645-52.
186. Fang XF, Zhao J, Shi WY *et al.* [Reconstruction tissue-engineered corneal epithelium using xenogeneic acellular corneal stroma as scaffold]. *Zhonghua Yan.Ke.Za Zhi.* 2008; **44**: 825-30.
187. Germain L, Auger FA, Grandbois E *et al.* Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 1999; **67**: 140-7.
188. Griffith M, Osborne R, Munger R *et al.* Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999; **286**: 2169-72.
189. Jiao Y, Li L, Ding Y *et al.* [Preparation and biocompatibility of a novel cornea scaffold material]. *Sheng Wu Yi.Xue.Gong.Cheng Xue.Za Zhi.* 2006; **23**: 556-9.
190. Larouche D, Paquet C, Fradette J *et al.* Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol.Biol.* 2009; **482**: 233-56.
191. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA *et al.* Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials* 2009; **30**: 1299-308.
192. McLaughlin CR, Tsai RJ, Latorre MA *et al.* Bioengineered corneas for transplantation and in vitro toxicology. *Front Biosci.* 2009; **14**: 3326-37.
193. Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H *et al.* Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 2006; **76**: 56-63.

194. Orwin E, Shah A, Voorhees A *et al.* Bioreactor design for cornea tissue engineering: Material-cell interactions. *Acta Biomater.* 2007; **3**: 1041-9.
195. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng* 2000; **6**: 307-19.
196. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br.J.Ophthalmol.* 2004; **88**: 560-5.
197. Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H *et al.* Amniotic membrane immobilized poly(vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 2007; **81**: 201-6.
198. Vemuganti GK, Fatima A, Madhira SL *et al.* Limbal stem cells: application in ocular biomedicine. *Int.Rev.Cell Mol.Biol.* 2009; **275**: 133-81.
199. Zhang YQ, Zhang WJ, Liu W *et al.* Tissue engineering of corneal stromal layer with dermal fibroblasts: phenotypic and functional switch of differentiated cells in cornea. *Tissue Eng Part A* 2008; **14**: 295-303.
200. Gimble JM, Youkhana K, Hua X *et al.* Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J.Cell Biochem.* 1992; **50**: 73-82.
201. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN *et al.* Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif.Tissue Int.* 1986; **38**: 143-54.
202. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI *et al.* In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp.Cell Res.* 1998; **238**: 265-72.
203. Llamas SG, Del RM, Larcher F *et al.* Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; **77**: 350-5.
204. Hokugo A, Takamoto T, Tabata Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials* 2006; **27**: 61-7.
205. Kawakita T, Espana EM, He H *et al.* Preservation and expansion of the primate keratocyte phenotype by downregulating TGF-beta signaling in a low-calcium, serum-free medium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2006; **47**: 1918-27.
206. Moll R, Franke WW, Schiller DL *et al.* The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; **31**: 11-24.

207. Cooper DL, Baptist EW, Enghild JJ *et al.* Bovine corneal protein 54K (BCP54) is a homologue of the tumor-associated (class 3) rat aldehyde dehydrogenase (RATALD). *Gene* 1991; **98**: 201-7.
208. Piatigorsky J. Gene sharing in lens and cornea: facts and implications. *Prog.Retin.Eye Res.* 1998; **17**: 145-74.
209. Piatigorsky J. Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes. More than meets the eye. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998; **842**: 7-15.
210. Abedinia M, Pain T, Algar EM *et al.* Bovine corneal aldehyde dehydrogenase: the major soluble corneal protein with a possible dual protective role for the eye. *Exp.Eye Res.* 1990; **51**: 419-26.
211. Bettelheim FA, Siew EL. Effect of change in concentration upon lens turbidity as predicted by the random fluctuation theory. *Biophys.J.* 1983; **41**: 29-33.
212. Evces S, Lindahl R. Characterization of rat cornea aldehyde dehydrogenase. *Arch.Biochem.Biophys.* 1989; **274**: 518-24.
213. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2006; **38**: 1625-31.
214. Birk DE, Lande MA, Fernandez-Madrid FR. Collagen and glycosaminoglycan synthesis in aging human keratocyte cultures. *Exp.Eye Res.* 1981; **32**: 331-9.
215. Cintron C, Hong BS. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type VI collagen. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1988; **29**: 760-6.
216. Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J.Cell Biol.* 1978; **76**: 561-8.
217. Jester JV, Petroll WM, Barry PA *et al.* Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1995; **36**: 809-19.
218. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F *et al.* Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J.Cell Biol.* 1993; **122**: 103-11.
219. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT *et al.* Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; **93**: 4219-23.
220. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu.Rev.Biochem.* 1996; **65**: 475-502.
221. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC *et al.* Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003; **83**: 1359-400.

222. Simon AM, Goodenough DA. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 1998; **8**: 477-83.
223. Donaldson P, Eckert R, Green C *et al.* Gap junction channels: new roles in disease. *Histol.Histopathol.* 1997; **12**: 219-31.
224. Chen Z, Evans WH, Pflugfelder SC *et al.* Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 1265-73.
225. Beyer EC, Kistler J, Paul DL *et al.* Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J.Cell Biol.* 1989; **108**: 595-605.
226. Petridou S, Masur SK. Immunodetection of connexins and cadherins in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1996; **37**: 1740-8.
227. Buck CA, Horwitz AF. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu.Rev.Cell Biol.* 1987; **3**: 179-205.
228. Virtanen I, Tervo K, Korhonen M *et al.* Integrins as receptors for extracellular matrix proteins in human cornea. *Acta Ophthalmol.Suppl* 1992; 18-21.
229. Ruoslahti E. Integrins. *J.Clin.Invest* 1991; **87**: 1-5.
230. Lauweryns B, van den Oord JJ, Volpes R *et al.* Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1991; **32**: 2079-85.
231. Masur SK, Cheung JK, Antohi S. Identification of integrins in cultured corneal fibroblasts and in isolated keratocytes. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1993; **34**: 2690-8.
232. Green KJ, Jones JC. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* 1996; **10**: 871-81.
233. Sawa Y, Kuroshima S, Yamaoka Y *et al.* Intracellular distribution of desmoplakin in human odontoblasts. *J.Histochem.Cytochem.* 2005; **53**: 1099-108.
234. Yamaoka Y, Sawa Y, Ebata N *et al.* Desmosomal proteins in cultured and intact human periodontal ligament fibroblasts. *Tissue Cell* 1999; **31**: 605-9.
235. Choong PF, Mok PL, Cheong SK *et al.* Mesenchymal stromal cell-like characteristics of corneal keratocytes. *Cytotherapy.* 2007; **9**: 252-8.
236. Dare EV, Vascotto SG, Carlsson D *et al.* Differentiation of a fibrin gel encapsulated chondrogenic cell line. *Int.J.Artif.Organs* 2007; **30**: 619-27.
237. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ *et al.* Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng* 2006; **12**: 1151-68.

238. Meana A, Iglesias J, Del RM *et al.* Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; **24**: 621-30.
239. Tuan TL, Song A, Chang S *et al.* In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp.Cell Res.* 1996; **223**: 127-34.
240. Chen J, Li Q, Xu J *et al.* Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif.Organs* 2005; **29**: 104-13.