



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

“Estudio histológico y fenotípico de un modelo experimental de deficiencia parcial de células madre limbares para evaluar nuevas terapias avanzadas”.

Autora: Jessica Nataly Figueroa Haro

Directoras: Teresa Nieto Miguel y M^a Carmen Martínez García

Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología.

2021-2022

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Superficie ocular	2
2.2.1 Córnea	2
2.2.2. Limbo	5
2.2.3. Conjuntiva	7
2.2. Deficiencia de células madre de limbo	7
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVOS	9
4.1. Objetivo General	9
4.2. Objetivos Específicos	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1. Estudio histológico	10
5.2. Inmunodetección	10
5.3. Análisis de las imágenes de inmunofluorescencia	11
5.4. Análisis estadístico	12
6. RESULTADOS	12
6.1. Análisis histológico de tejidos oculares sanos y de tejidos oculares con deficiencia parcial de células madre limbares	12
6.2. Determinación de los niveles de expresión de los marcadores de epitelio corneal y limbar	16
7. DISCUSIÓN	21
8. CONCLUSIONES	24
9. LIMITACIONES	25
10. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

Introducción: La deficiencia de células madre de limbo (LSCD) es una patología que se caracteriza por la invasión de la conjuntiva sobre la córnea, la aparición de defectos epiteliales, neovascularización y opacidad corneal; todo ello acompañado de inflamación, dolor crónico y pérdida de visión.

Objetivo: Estudiar a nivel histológico y fenotípico la superficie ocular de un modelo experimental de LSCD parcial para determinar si este modelo sería válido para evaluar nuevas terapias avanzadas.

Materiales y métodos: Mediante tinción con ácido periódico de Schiff, se realizó un estudio histológico de muestras oculares procedentes de 4 conejos New-Zealand-White con LSCD parcial. Mediante inmunohistoquímica se analizaron los niveles de expresión de marcadores de epitelio corneal (CK3 y E-cadherina) y limbar (CK15 y p63).

Resultados: En comparación con los tejidos sanos, los tejidos con LSCD parcial presentaron mayor cantidad de capas epiteliales en la córnea, presencia de células caliciformes y mucina en las capas epiteliales próxima al daño, y mayor presencia de vasos sanguíneos y de infiltrados inflamatorios en el estroma de los tejidos cercanos al daño. Los niveles de expresión de CK15 y p63 fueron significativamente menores en los tejidos dañados que en los sanos. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CK3 y E-cadherina entre los tejidos sanos y dañados.

Conclusión: El modelo experimental de LSCD estudiado presenta características histológicas y fenotípicas similares a las mostradas por esta enfermedad en seres humanos y sería, por tanto, un modelo válido para evaluar la seguridad y la eficacia de nuevas terapias avanzadas.

Palabras clave: Deficiencia de células madre de limbo; Células madre epiteliales limbares, Superficie ocular, Córnea; Limbo; Modelo animal.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Superficie ocular

La superficie ocular forma una unidad anatómica y funcional que está compuesta por cuatro componentes principales: la córnea, la conjuntiva, el limbo y la película lagrimal (Figura 1). Un conjunto de vasos sanguíneos (vasculatura) cubren toda la superficie ocular, excepto la córnea, que es avascular. La vasculatura suministra nutrientes, elimina catabolitos y ayuda a la defensa de la superficie ocular frente a enfermedades infecciosas, puesto que está directamente expuesta al medio exterior y, por tanto, amenazada por diversos antígenos y microorganismos patógenos. Las principales funciones de la superficie ocular son proporcionar una correcta visión y proteger el medio intraocular [1, 2].

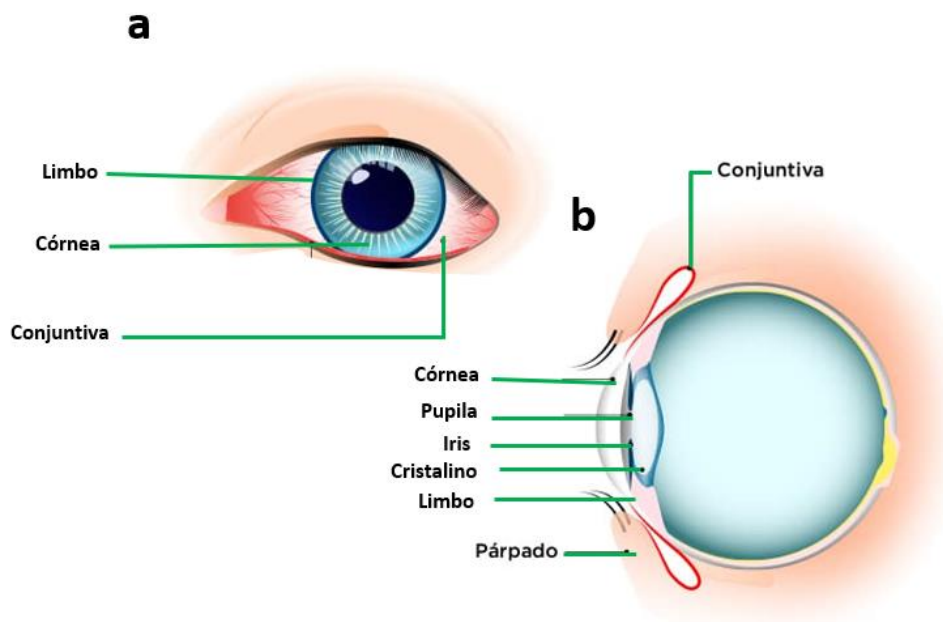


Figura 1. Representación esquemática de la vista frontal de la superficie ocular y localización en ella del limbo, la córnea y la conjuntiva (a). Representación esquemática de un corte transversal de un ojo en donde se muestra la localización de la conjuntiva, la córnea, la pupila, el iris, el cristalino, el limbo y los párpados (b). Imagen tomada de iStock by Getty Images [3].

2.2.1 Córnea

La córnea es una estructura que se encuentra en la parte frontal transparente del ojo y que, junto al cristalino, permiten la refracción y la transmisión de la luz a la retina para el procesamiento visual [4, 5]. Tiene una forma cóncavo-convexa y mide de 11 a 12 mm horizontalmente y de 9 a 11 mm en vertical. Posee una cara anterior que está en contacto con la película lagrimal pre-corneal y otra cara posterior, en contacto con el humor acuoso. Las interacciones con la película lagrimal pre-corneal y con el humor acuoso permiten que la córnea no tenga vasculatura ya que a través de estos medios obtiene el oxígeno y los nutrientes y elimina los productos de desecho [6]. La córnea está formada por seis capas, las cuales son: el epitelio corneal, la membrana de Bowman, el estroma corneal, la capa Dua, la membrana de Descemet y el endotelio corneal (Figura 2) [4, 7].

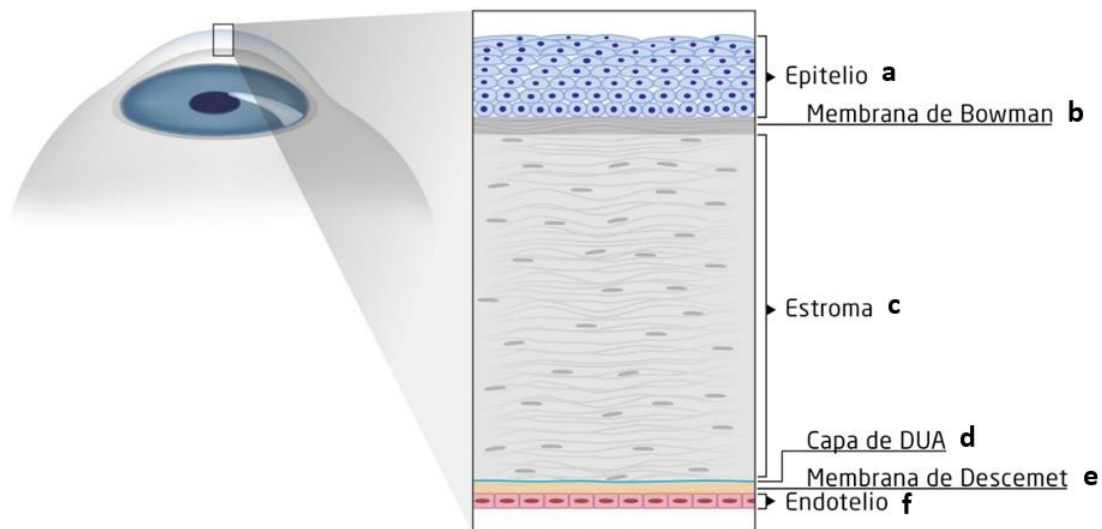


Figura 2. Esquema de un corte histológico transversal en el que se representan las distintas capas de la córnea: el epitelio (a), la membrana de Bowman (b), el estroma (c), la capa Dua (d), la membrana de Descemet (e) y el endotelio (f). Imagen tomada de Área Oftalmológica Avanzada [8].

Epitelio Corneal

El epitelio corneal humano tiene alrededor de 50 μm de espesor y contiene entre 5 y 7 capas celulares de epitelio escamoso estratificado no queratinizado que le proporciona una superficie lisa y regular (Figura 2a). En la zona periférica, el número de capas aumenta entre 8 y 10. Estas células se dividen rápidamente para mantener la homeostasis de la superficie ocular. Una de sus principales características es que mantiene la actividad metabólica y de barrera frente a los agentes externos, presentando una fuerte resistencia a la abrasión y una rápida cicatrización. Las células del epitelio corneal tienen un tiempo de vida útil de siete a diez días y experimentan involución, apoptosis y descamación. La constante renovación del epitelio corneal es posible gracias a las células madre epiteliales limbares (LESCs, de sus siglas en inglés “Limbic Epithelial Stem Cells”), localizadas en el limbo esclerocorneal. Estas células madre proliferan, se diferencian y migran centripetamente desde el limbo hacia el centro de la córnea [7, 9, 10]. En el epitelio corneal, se distinguen tres tipos celulares que se distribuyen en 3 estratos: las dos primeras capas son de células superficiales escamosas y aplanadas que, a medida que envejecen, se descaman. Estas células presentan microvellosidades ubicadas en la superficie y uniones intercelulares estrechas muy desarrolladas que confieren resistencia y ejercen de barrera frente al paso de sustancias externas; las tres capas siguientes son células intermedias, éstas tienen un gran número de interdigitaciones entre ellas; y la última capa del epitelio está formada por células basales, o células columnares que descansan sobre la membrana basal [2, 11–13]. Las células del epitelio corneal expresan una serie de marcadores característicos de este tipo celular como las citoqueratinas (CK) 3 (CK3) y CK12, la E-Cadherina y la aldehído deshidrogenasa 3 (ALDH3), entre otros [13].

Membrana de Bowman

La membrana de Bowman, es una capa acelular de 8-12 μm de espesor (Figura 2b) que se encuentra debajo de la membrana basal del epitelio corneal y que termina abruptamente en el limbo. Está conformada principalmente por fibras de colágeno de tipo I y V, y por proteoglicanos que están organizados de forma irregular. En el caso de que esta capa sufra una lesión, no tiene la capacidad para regenerarse [7]. Aunque varios científicos han propuesto que la

membrana de Bowman mantiene la forma de la córnea, estudios recientes sugieren que la eliminación de esta capa no altera de forma apreciable las propiedades mecánicas de la misma [5]. La membrana de Bowman se encuentra en humanos y en la mayoría de los primates, en pollos, peces cebras, jirafas, codornices, ciervos, antílopes, leones marinos de California, conejillos de indias, entre otras, pero no se encuentra en perros, lobos, gatos, tigres, vacas, leones, conejos, cerdos, cabras o caballos [14].

Estroma Corneal

El estroma corneal ocupa aproximadamente el 90% del grosor de la córnea (Figura 2c), siendo su espesor aproximadamente de 500 μm . Se encuentra debajo de la membrana de Bowman y encima de la membrana de Descemet. Está compuesto por unas 200 capas de fibrillas de colágeno, cada una con un grosor aproximado de 2 μm , y por glicosaminoglicanos. Las fibrillas de colágeno son producidas por queratocitos, que ocupan alrededor del 3-5% del volumen estromal [15, 16]. La transparencia característica del estroma se debe a la uniformidad del diámetro de las fibrillas de colágeno, y a su disposición y orientación en forma de láminas paralelas distribuidas de manera ortogonal. La luz que entra en la córnea es dispersada por cada fibrilla en dirección hacia adelante, permitiendo que la luz pase a la retina [17].

Capa de Dua

En junio de 2013, se propuso la existencia de la capa de Dua como una capa consistente y bien definida que mide unos 15 μm de espesor y está situada entre el estroma corneal y la membrana de Descemet (Figura 2d) [18]. A pesar de ser muy delgada, esta capa se ha descrito como altamente resistente e impermeable al aire, soportando hasta 2 bares de presión [18]. Pese a proponerse como una capa integrante de la estructura histológica de la córnea, a día de hoy, su existencia es cuestionada y discutida por parte de la comunidad científica.

Membrana de Descemet

La membrana de Descemet es una matriz interfacial que integra el estroma posterior con la membrana basal del endotelio corneal, está formada principalmente por fibras de colágeno IV, vitronectina, perlecan, fibronectina y laminina, y tiene un espesor de 7 a 12 μm (Figura 2e). Esta capa es una membrana elástica y resistente [7].

Endotelio corneal

El endotelio corneal es una monocapa de células hexagonales uniformes con un espesor de unas 5 μm , ubicadas en la superficie interna de la córnea (Figura 2f) en contacto directo con el humor acuoso y la cámara anterior del ojo. Es una estructura semipermeable que permite el paso del humor acuoso, el cual aporta oxígeno y nutrientes como glucosa al interior de la córnea. Por otro lado, posee un mecanismo que transporta activamente el agua en sentido reverso, mediante gasto energético siendo esta característica fundamental para evitar que la córnea retenga líquidos. En caso de que el endotelio no conserve un balance de fluidos, el estroma se hincha, lo cual provocará la pérdida de transparencia de la córnea. El endotelio corneal no se regenera, pero se estira para compensar la pérdida de células muertas. Un individuo al nacer tiene aproximadamente de 3500 a 4000 células por mm^2 , siendo el mínimo necesario para su funcionamiento de 300 a 600 células por mm^2 [7, 11].

2.2.2. Limbo

El limbo, también llamado limbo esclerocorneal, es la zona de transición entre la córnea (transparente) y la esclero-conjuntiva (opaca) (Figura 1a). El limbo mide aproximadamente entre 1,5 y 2 mm de ancho y forma un anillo que rodea el contorno de la córnea. A pesar de su pequeño tamaño, el limbo se encarga de la nutrición de la córnea periférica, de la renovación del epitelio corneal y contiene, además, las principales vías de salida del humor acuoso, las cuales son necesarias para el mantenimiento de la presión intraocular. Además, actúa como barrera física, impide que la conjuntiva invada la córnea y evita que la conjuntiva vascularizada y translúcida invada la córnea y disminuya la visión [19–22]. El limbo está formado por varios componentes importantes que son: el epitelio limbar, el estroma limbar y sistema de drenaje del humor acuoso.

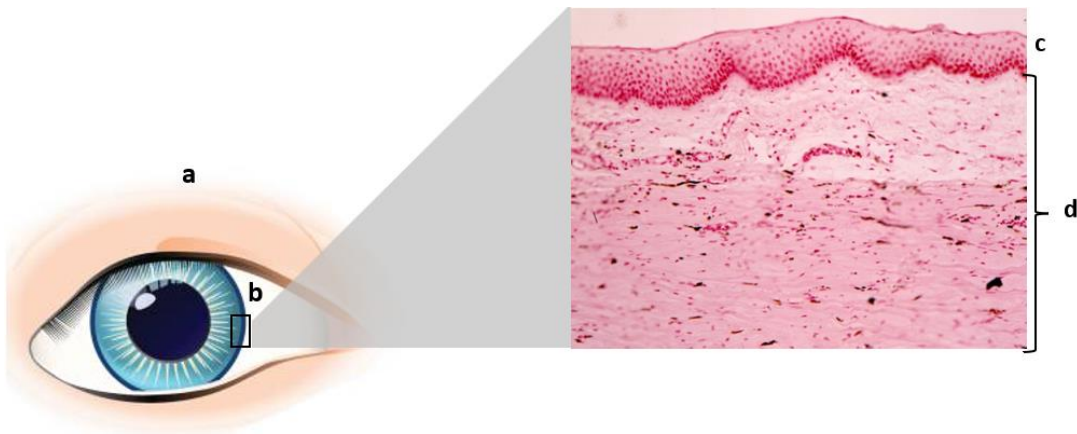


Figura 3. Localización anatómica del limbo en la superficie ocular: Vista frontal de un ojo (a) y localización del limbo (b). Corte histológico transversal de un limbo humano teñido con Hematoxilina-Eosina en donde se muestran el epitelio limbar (c) y el estroma limbar (d). Imagen histológica cedida por Martínez C. del Departamento de Biología Celular, Genética e Histología de la Universidad de Valladolid.

Epitelio Limbar

El epitelio limbar está ubicado sobre el estroma (Figura 3d), de donde recibe aporte sanguíneo, debido a que es una zona altamente vascularizada. Los vasos sanguíneos que conforman el estroma, forman parte de las empalizadas de Vogt, que son estructuras fibrovasculares en forma de valles y crestas que se disponen de manera radial a la córnea, en donde se encuentran diferentes poblaciones celulares con diferentes grados de diferenciación. El epitelio limbar está formado por aproximadamente 10 capas epiteliales: las células de las capas superficiales se encuentran en estado de diferenciación avanzado, las siguientes 6 capas están formadas por células en estado intermedio de diferenciación y la capa más basal está formada por las ya mencionadas anteriormente células madre epiteliales limbares (LESCs). Las empalizadas de Vogt también nutren y proporcionan citoquinas al epitelio, estas citoquinas juegan un papel importante en el mantenimiento de las LESCs. En el epitelio limbar se ha descrito la presencia de otros tipos celulares como linfocitos T, células presentadoras de antígenos y melanocitos encargados de proteger a las LESCs de la radiación ultravioleta [19].

Las LESCs son células de pequeño tamaño, poseen una alta capacidad proliferativa como respuesta a un daño, presentan un ciclo celular corto, tienen capacidad de autorrenovación, es decir, tienen la capacidad de dividirse de forma asimétrica, produciendo dos células hijas, de las cuales una mantendrá las características de célula madre y la otra migrará para diferenciarse a epitelio corneal. Las LESCs poseen marcadores moleculares de expresión propios, como las

CK14 y CK15, la proteína transportadora de ATP ABCG2 y el factor de transcripción p63, entre otros [13, 20]. En 1983, Thoft y Friend publicaron su hipótesis “X, Y, Z”, donde propusieron la existencia de tres fenómenos que mantienen la masa de las células epiteliales corneales (Figura 4) [21]. El componente “X” hace referencia a la proliferación de células epiteliales basales y su migración hacia la superficie. El componente “Y” sería la contribución a la masa de células epiteliales de la córnea debida al movimiento centripeto de las células periféricas. El componente “Z” sería la pérdida de células epiteliales corneales diferenciadas por descamación normal. El componente “Y” de esta hipótesis inicialmente no pudo ser probado. Por ello, la hipótesis “X, Y, Z” no pudo ser validada hasta que tras años de investigación exhaustiva no se demostró que el componente “Y” era la masa de células madre del limbo [22].

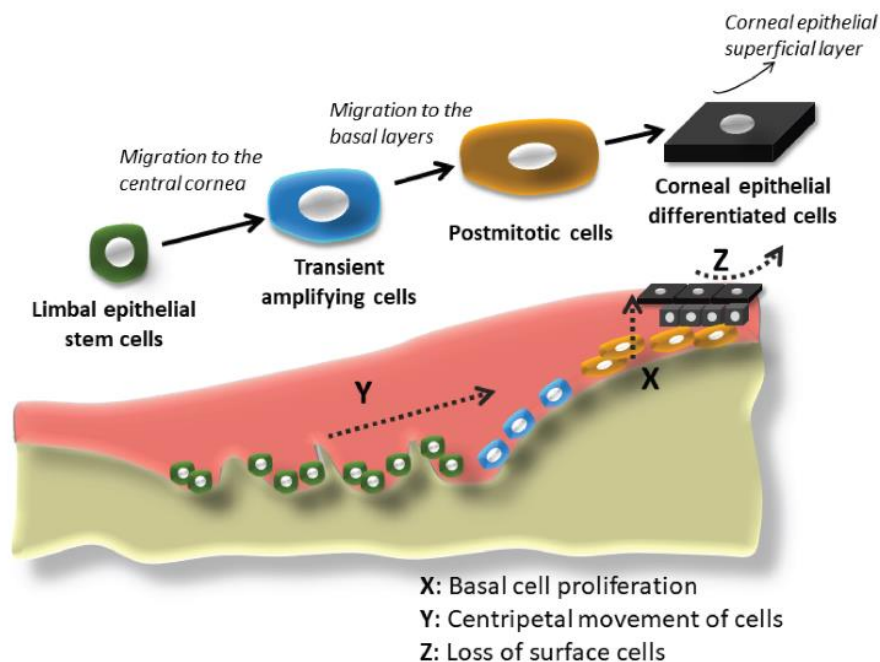


Figura 4. Representación gráfica del nicho de las células madre epiteliales limbares con todos los estados celulares implicados en la regeneración del epitelio corneal. La hipótesis “X, Y, Z”, presenta los tres fenómenos diferentes que permiten que la masa de células epiteliales corneales se mantenga constante. X: proliferación de células epiteliales basales; Y: contribución a la masa celular por el movimiento centripeto de las células periféricas; Z: pérdida de células epiteliales por descamación constante de la superficie. Imagen tomada de Calonge M., et al [23]

Estroma Limbar

El estroma limbar es un tejido altamente vascularizado e innervado, que está principalmente formado por fibras de colágeno tipo IV y VII. A nivel celular, su principal componente son los fibroblastos. Además, se ha demostrado mediante inmunotinción la presencia de células madre mesenquimales en el estroma limbar, debido a que éstas expresaron CD90 y CD105, marcadores típicos de las células madre mesenquimales. Las células madre encontradas en el estroma limbar son capaces de generar fibroblastos estromales, reemplazar los queratocitos corneales, y participar en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre epiteliales [24].

Sistema de drenaje del humor acuoso.

El sistema de drenaje del humor acuoso está constituido por la red o malla trabecular y el canal de Schlemm. La red trabecular es una estructura esponjiforme de finas trabéculas, responsables del drenaje del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo hacia el canal de

Schlemm, que es un conducto anular que se extiende alrededor de toda córnea y que desemboca en la circulación sanguínea [25].

2.2.3. Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa delgada que recubre la superficie interna de los párpados y se curva hacia la superficie anterior del globo ocular donde se extiende hasta el limbo. Tiene un papel vital tanto en la visión como en la inmunidad, ya que sirve como barrera física contra agentes extraños y, gracias a su vascularización y a la presencia de tejido linfoide, actúa como barrera inmunológica frente a patógenos para combatir infecciones y eliminar tejido dañado [30, 31]. A nivel histológico, la conjuntiva está formada por dos capas principales que son: el epitelio y el estroma subyacente [26].

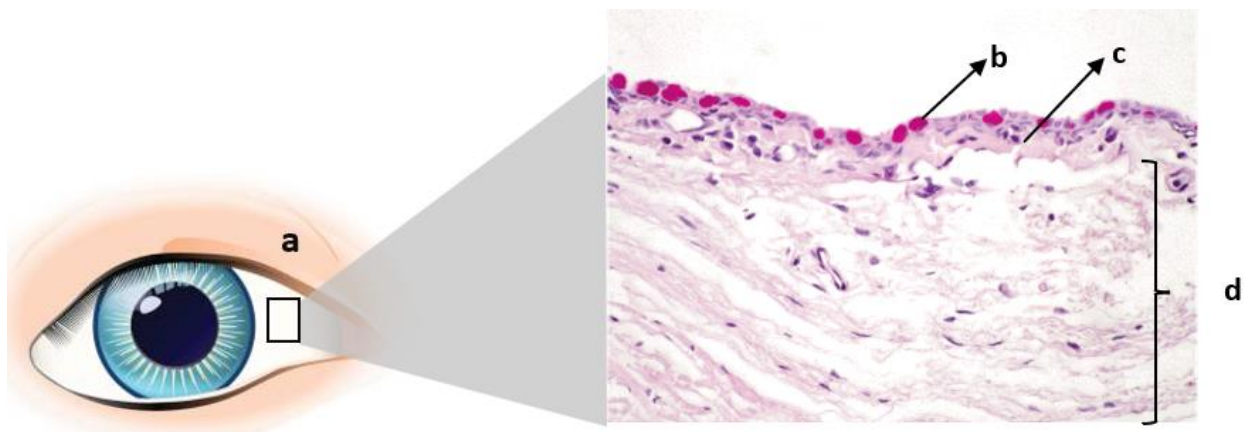


Figura 4. Localización anatómica de la conjuntiva en la superficie ocular (a). Sección histológica transversal de conjuntiva humana teñida con ácido periódico de Schiff (PAS): células calciformes (b), epitelio estratificado no queratinizado (c) y estroma (d). Imagen tomada de Saornil, M., et al.[27].

Epitelio conjuntival

El epitelio conjuntival humano es un epitelio estratificado cilíndrico no queratinizado que tiene entre 4 y 6 capas celulares de espesor (Figura 4c). Una característica importante del epitelio conjuntival es la presencia de células calciformes (Figura 4b), que son células secretoras de mucinas, como la MUC5AC, que forma parte de capa mucínica de la película lagrimal [7, 28]. Además de mucinas, las células calciformes secretan los péptidos TFF1 y TFF3. Las mucinas junto a los péptidos promueven la migración de las células epiteliales de la córnea y tienen propiedades antiapoptóticas [12].

Estroma conjuntival

El estroma conjuntival está constituido por tejido conectivo laxo muy vascularizado que tiene vasos sanguíneos y vasos linfáticos, tejido linfoide, así como también colágeno, fibroblastos, linfocitos, células de Langerhans ocasionales, mastocitos, eosinófilos y células plasmáticas (Figura 4d). Es por esto que el estroma conjuntival es importante en la regulación de las respuestas inmunitarias de la superficie ocular [27].

2.2. Deficiencia de células madre de limbo

Las LSCs residen en la base de las criptas de las empalizadas de Vogt. Este nicho no solo proporciona un entorno protector, sino también los factores indispensables para mantener las

características de las LSCs y dar inicio a vías de diferenciación en respuesta a estímulos externos [19].

La disfunción o destrucción de las LSCs, o de su nicho, da como resultado una condición patológica conocida como deficiencia de células madre limbares (LSCD, siglas provenientes del inglés “Limbal Stem Cell Deciciency”) [29]. La LSCD puede ser causada por una amplia variedad de lesiones o trastornos de la superficie ocular como quemaduras térmicas o químicas, el uso abusivo de lentes de contacto, cirugías oculares múltiples, infecciones, enfermedades autoinmunes (como el síndrome de Stevens-Johnson o el síndrome de Sjögren), o por enfermedades congénitas como la aniridia congénita, entre otros. [30, 31]. Estas causas pueden originar LSCD total (afectando a los 360° del limbo) o sectorial (afectando sólo a una zona del limbo), y LSCD unilateral (cuando sólo se ve afectado uno de los ojos) o, más frecuentemente, bilateral (cuando los dos ojos se encuentran afectados). Los pacientes con LSCD presentan defectos epiteliales corneales persistentes que con frecuencia se ulceran, neovascularización y opacidad corneal, enrojecimiento conjuntival, fotofobia, blefaroespasma, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo, episodios recurrentes de dolor, inflamación y, finalmente, disminución o pérdida de la visión, debido a que la conjuntiva (vascularizada y no transparente) termina invadiendo la córnea como consecuencia de la ausencia de LSCs o de la incapacidad de las mismas para reponer el epitelio corneal dañado [23, 30].

Entre los tratamientos actualmente disponibles para los pacientes que padecen LSCD se encuentra el trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET, del inglés “Cultivated Limbal Epithelial Transplantation”. En el caso de que la LSCD afecte a un solo ojo, es posible realizar un CLET autólogo tomando una pequeña biopsia de tejido limbar del ojo contralateral sano que, tras ser cultivada *in vitro*, es trasplantada al ojo afectado [32]. Sin embargo, la alta incidencia de casos bilaterales hace necesaria la realización de CLET alogénicos, cultivados a partir de biopsias obtenidas de ojos de donantes cadáver [33]. Pese a su elevada tasa de éxito, los CLET alogénicos presentan el gran problema de la escasez de donantes y la necesidad de administrar inmunosupresores para reducir el riesgo de rechazo [30, 34–36]. Con el fin de dar soluciones a estos problemas, numerosos grupos de investigación a lo largo de todo el mundo están tratando de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan solventar las limitaciones de los tratamientos actualmente disponibles. Entre ellas, las conocidas como terapias avanzadas, es decir, aquellas que utilizan genes, células y/o tejidos como recurso terapéutico, han experimentado un interés y desarrollo exponencial en los últimos años proponiendo alternativas terapéuticas muy prometedoras [37].

Para poder evaluar la seguridad y la eficacia de nuevos tratamientos, es indispensable disponer de modelos animales que remeden lo más fehacientemente posible las características patológicas de la enfermedad que se quiere tratar. A nivel corneal, se han desarrollado modelos de daño corneal por causticación mediante la aplicación de hidróxido sódico en ojos de conejos, ratas y cerdos [38]. Sin embargo, en estos modelos no se puede verificar la eficacia de tratamientos dirigidos a la LSCD porque el limbo en estos modelos no se ve realmente afectado. La mayoría de los modelos experimentales de LSCD consisten en una quemadura química del limbo y, a veces, de la córnea, con etanol o n-heptanol. En algunos modelos, además de la quemadura química, el daño se complementa mediante un raspado de restos epiteliales con un cuchillete. Estos modelos se han desarrollado en ratón, rata y conejo, y, aunque se corrobora la eliminación del epitelio mediante tinción con fluoresceína sódica, las células madre epiteliales limbares se encuentran protegidas en la base de las empalizadas de Vogt y son difíciles de eliminar. Otros modelos de LSCD son los basados en la eliminación quirúrgica del limbo o limbectomía, acompañados de una quemadura corneal. Estos modelos tienen como ventaja que mediante la limbectomía se asegura la eliminación de las células madre limbares [39–42].

La mayoría de los modelos de LSCD publicados son modelos totales de LSCD, es decir, modelos con los 360° del limbo afectado. Sin embargo, las causas de LSCD no siempre afectan los 360° del limbo, estando en ocasiones el limbo únicamente afectado de manera parcial. Es por esto que existen pocos estudios realizados en modelos parciales y, por lo tanto, pocos tratamientos dirigidos a ellos [4, 27, 47]. Con este trabajo se pretende estudiar a nivel histológico y fenotípico la superficie ocular de un modelo experimental de deficiencia parcial de células madre limbares para determinar si este modelo sería válido para evaluar nuevas terapias avanzadas basadas en células y/o tejidos.

3. HIPÓTESIS

Los tejidos de la superficie ocular de conejos sometidos a un daño limbar parcial presentan diferencias histológicas y fenotípicas con los tejidos sanos y constituyen un modelo válido para evaluar nuevas terapias avanzadas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar a nivel histológico y fenotípico la superficie ocular de un modelo experimental de deficiencia parcial de células madre limbares para determinar si este modelo sería válido para evaluar nuevas terapias avanzadas.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Estudiar la estructura histológica de la superficie ocular de conejos con deficiencia limbar parcial.
- b) Estudiar el fenotipo epitelial de las células de la superficie ocular de conejos con deficiencia limbar parcial.
- c) Verificar a nivel bibliográfico si el modelo de deficiencia limbar parcial estudiado es adecuado para evaluar nuevas terapias avanzadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras histológicas utilizadas para realizar este trabajo procedían de 4 conejos adultos New Zealand White a los que en el globo ocular derecho se les había inducido una deficiencia limbar parcial mediante desepitelización completa de la córnea con n-heptanol, seguida de una limbectomía quirúrgica de los 180° del limbo (de VII a I según los husos horarios en el ojo derecho, incluyendo limbo superior y temporal) [13]. Los ojos contralaterales fueron utilizados como ojos control sanos. Transcurridas 11 semanas desde la generación del daño, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los botones esclerolimbocorneales, los cuales fueron fijados con formaldehído tamponado al 4% y posteriormente procesados e incluidos en parafina. Para realizar tanto el estudio histológico mediante tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff) como el estudio fenotípico del epitelio corneal y limbar mediante inmunofluorescencia, los bloques de parafina fueron tallados y posteriormente se realizaron cortes de un espesor de 5-6 μm con un microtomo.

5.1. Estudio histológico

Para realizar estos ensayos, los portaobjetos con los cortes de los tejidos se colocaron en la estufa a 60°C durante 30 min, se incubaron en: xileno al 100% tres veces durante 5 minutos, en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96% y 80%) durante 4 minutos y se realizaron tres lavados, dos con agua corriente y uno con agua destilada durante 2 minutos cada uno, todo esto con el fin de desparafinar los tejidos. Se sumergieron los tejidos en una solución de ácido periódico al 0,5% durante 5 minutos y se realizaron lavados con agua corriente y con agua destilada. Posteriormente, se incubaron los tejidos en oscuridad con el reactivo de Schiff durante 15 minutos y se realizaron lavados en agua corriente y agua destilada durante 10 minutos. A continuación, se incubaron los tejidos con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos y, una vez pasado este tiempo, se lavaron bajo el grifo con agua corriente durante 5 minutos. Seguidamente, las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes (96% y 100%) dos veces en cada uno durante 2 minutos y se incubaron con xileno al 100% tres veces con pases de 5 minutos cada uno. Finalmente, se colocó un cubreobjetos sobre cada portaobjetos poniendo dos gotas de medio de montaje Entellan, (Merck; Darmstadt, Germany) en cada uno y se dejaron secar durante 2 horas antes de su visualización.

Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica DM4000B (Leica; Wetzlar, Alemania). De cada conejo se analizaron tres portaobjetos con dos cortes cada uno (un total de 6 cortes por conejo). En cada corte se evaluó el número de capas de células epiteliales, el número de células caliciformes, la presencia o ausencia de mucina sobre los epitelios y la presencia o ausencia de vasos sanguíneos en el estroma. La cantidad de células inflamatorias en el estroma se semicuantificó utilizando la siguiente escala de valoración: 0: no hay infiltrados inflamatorios; 1: las células inflamatorias ocupan 1/3 del área estromal total de forma dispersa; 2: las células inflamatorias ocupan 1/3 del área estromal total formando cúmulos; 3: las células inflamatorias ocupan entre 1/3 y 2/3 del área estromal total; 4: las células inflamatorias ocupan más de 2/3 del área estromal total de forma dispersa; 5: las células inflamatorias ocupan más de 2/3 del área estromal total formando cúmulos.

5.2. Inmunodetección

En primer lugar, los portaobjetos con los cortes de tejido se desparafinaron siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio histológico. Posteriormente, se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante incubación con tripsina (Sigma- Aldrich; St Louis, MO, USA) al 0,1% (preparada con tampón fosfato salino, o PBS del inglés "Phosphate-buffered saline") durante 20 minutos a 37°C.

La técnica de inmunodetección se realizó en una cámara húmeda. En primer lugar, se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 5 minutos, luego se marcaron los bordes de los tejidos con el rotulador hidrófóbico PapPen (Invitrogen; Massachusetts, USA), esto asegura que no se exceda la cantidad de anticuerpo necesaria y que se seque el tejido, posteriormente se realizó el bloqueo y la permeabilización de los tejidos incubando las muestras en una solución de suero de burro (Sigma-Aldrich) al 5%, tritón (Sigma-Aldrich) 0,3 % en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez pasado este tiempo, se retiró la solución de boqueo y permeabilización y los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 1) a la dilución correspondiente en suero de burro al 5% en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS 1X, y se incubaron con el anticuerpo secundario Donkey anti-mouseAlexaFluor 488 (1:200) (Invitrogen; Massachusetts, USA), en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente protegiendo la muestra de la luz.

A continuación, se realizaron tres lavados en horizontal con PBS 1X durante 5 minutos y las muestras se incubaron con Vector TrueView Autofluorescence Quenching Kit (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) durante 3 minutos para eliminar la autofluorescencia. Seguidamente, se realizó un lavado con PBS 1X durante 5 minutos y se procedió a incubar los tejidos con el fluoróforo nuclear Hoechst (2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1hbenzimidazol trihidrocloruro trihidrato) (Sigma-Aldrich) (dilución 1:250 en PBS 1X) durante 10 minutos en cámara húmeda protegida de la luz. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X durante 5 minutos y un último lavado con agua corriente. Finalmente, se colocó un cubreobjetos sobre cada portaobjetos poniendo dos gotas de medio de montaje de fluorescencia Vectashield Vibrance (Vector Laboratories) en cada uno de ellos, y se dejaron secar durante 2 horas antes de su visualización.

Tabla 1: Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especificidad	Categoría	Clon	Casa comercial	Dilución
Anti- citoqueratina 3 (CK3)	Epitelio corneal	Ratón (Monoclonal)	AE-5	Mp biomedicals (Ohio, USA)	1/50
Anti- citoqueratina 15 (CK15)	Células madre epiteliales limbares	Ratón (Monoclonal)	LHK15	MERK (Cambridge, UK)	1/50
Anti-P63 (P63)	Células madre epiteliales limbares	Ratón (Monoclonal)	4A4	Abcam (Cambridge, UK)	1/50
Anti- E-Cadherina (E-Cad)	Epitelio corneal	Ratón (Monoclonal)	36	BD Biosciences (Nueva Jersey, USA)	1/100

Todos los tejidos fueron observados y fotografiados en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMI6000 B). De cada botón esclerolimbocorneal se analizaron, al menos, dos cortes por cada marcador (CK3, E-cadherina, P63 y CK15) para tener las muestras por duplicado; y de cada corte se tomaron siete fotografías, para obtener imágenes representativas de cada zona del tejido a analizar (conjuntiva superior, limbo superior, córnea superior, córnea central, córnea inferior, limbo inferior y conjuntiva inferior). En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en los cuales el paso de la incubación con el anticuerpo primario se realizó únicamente con tampón de bloqueo y permeabilización sin el anticuerpo (PBS 1X con suero de burro al 5% y tritón al 0,3%).

5.3. Análisis de las imágenes de inmunofluorescencia

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se llevó a cabo con el programa ImageJ, utilizando el “plugin” que abre bio-formatos. Para ello, se abrieron las imágenes en formato LIF (*Leica Image Format*) y, de los tres canales desplegados, se seleccionó aquel en el que se observaba la fluorescencia del marcador estudiado. Utilizando la opción “Polygon selection” de la barra de tareas se seleccionó la zona del tejido que se quería analizar (Figura 5) y, una vez seleccionada el área de interés, mediante la opción de análisis de datos se recogieron los datos

de las medias de los valores en grises del área seleccionada y la medida del área de la zona seleccionada. Este análisis se realizó en, al menos, dos cortes histológicos de cuatro ojos sanos y de cuatro ojos con deficiencia parcial de células madre limbares.

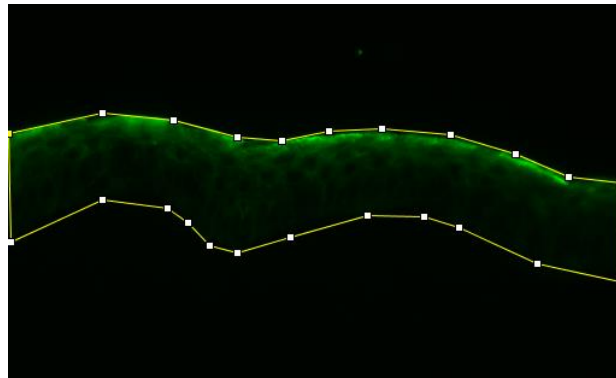


Figura 5. Selección en una imagen de microscopía de fluorescencia de la zona de tejido en la cual se observa la emisión de fluorescencia (en verde) utilizando el programa ImageJ.

5.4. Análisis estadístico

Las medias obtenidas se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 y se realizó un test ANOVA de una vía y representando la media de los datos normalizados al dato con el valor más pequeño \pm la desviación típica. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En donde *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$ y ***: $p \leq 0,001$.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis histológico de tejidos oculares sanos y de tejidos oculares con deficiencia parcial de células madre limbares

El análisis histológico se realizó mediante la tinción de PAS en los tejidos procedentes de ojos sanos y en los tejidos procedentes de ojos con deficiencia parcial de células madre limbares. Esta tinción tiñe de fucsia los mucopolisacáridos de las células caliciformes y de morado los núcleos celulares, permitiendo identificar fácilmente la estructura histológica de los tejidos presentes en la superficie ocular (conjuntiva inferior, limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior, limbo superior y conjuntiva superior), así como también las células inflamatorias (células pequeñas con poco citoplasma y núcleo grande y redondeado de color morado), y los vasos sanguíneos (Figura 6).

Se realizó el recuento de capas de células epiteliales (ce) y se observó que los tejidos sanos no presentaron diferencias significativas entre la córnea inferior, central y superior (4-5 ce), tampoco entre la conjuntiva inferior y superior (3-4 ce), ni en el limbo inferior y superior (5-6 ce) (Figura 7). Sin embargo, los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron un número significativamente mayor de capas epiteliales en la córnea central y superior (5-6 ce) que los tejidos sanos, pero el limbo superior presentó un número significativamente menor de capas epiteliales (4-5 ce) que los tejidos sanos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en relación al número de capas de células epiteliales en la conjuntiva inferior, el limbo inferior, la córnea central y la conjuntiva superior (Figura 7).

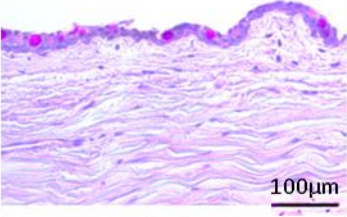
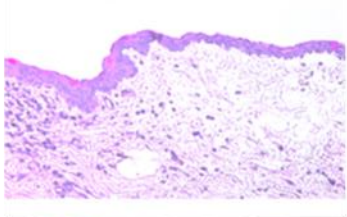
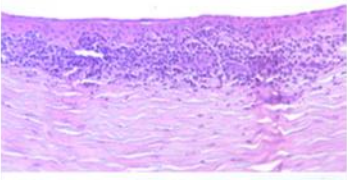
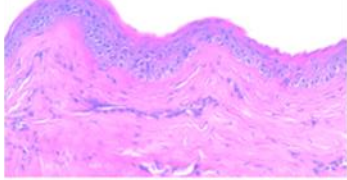
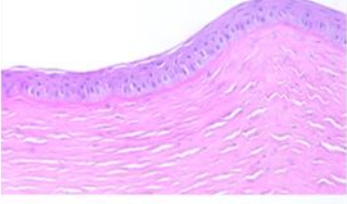
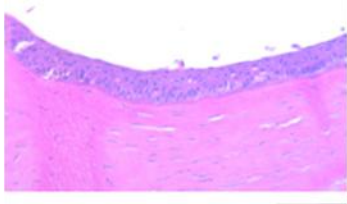
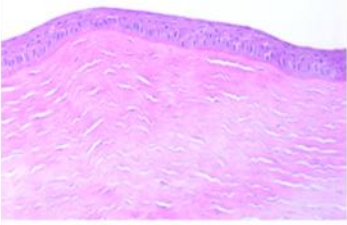

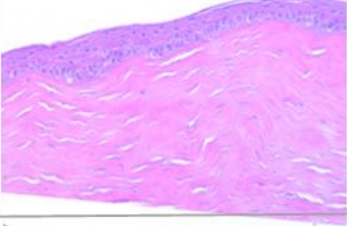
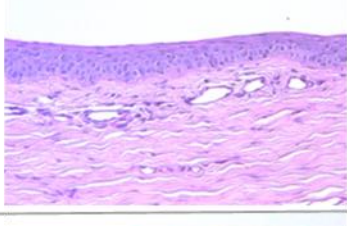
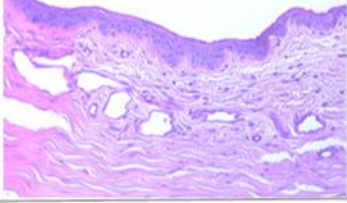
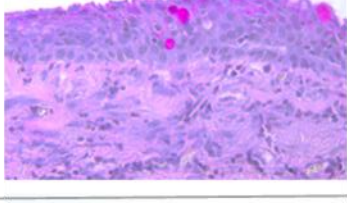
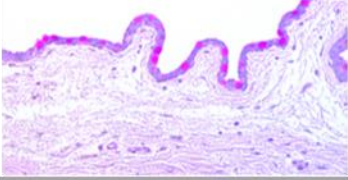
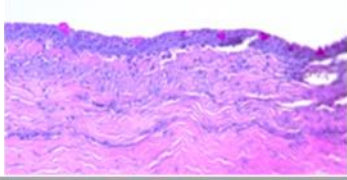
	Sano	Dañado
Conjuntiva inferior		
Limbo inferior		
Córnea inferior		
Córnea central		
Córnea superior		
Limbo superior		
Conjuntiva superior		

Figura 6. Estudio histológico. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con PAS procedentes de ojos sanos (n=4), ojos con deficiencia de células madre limbares parcial (dañado) (n=4). Los tejidos dañados fueron obtenidos once semanas tras la desepitelización completa de la córnea con n-heptanol, seguida de una limbectomía quirúrgica de los 180° del limbo. En color rosa fucsia se pueden observar las células caliciformes en el epitelio y en color azul/morado los núcleos celulares de las células inflamatorias (cúmulos de linfocitos: células pequeñas con poco citoplasma y núcleo grande y redondeado) en el estroma. Imágenes realizadas a 20X. Barra de escala: 100 μ m.

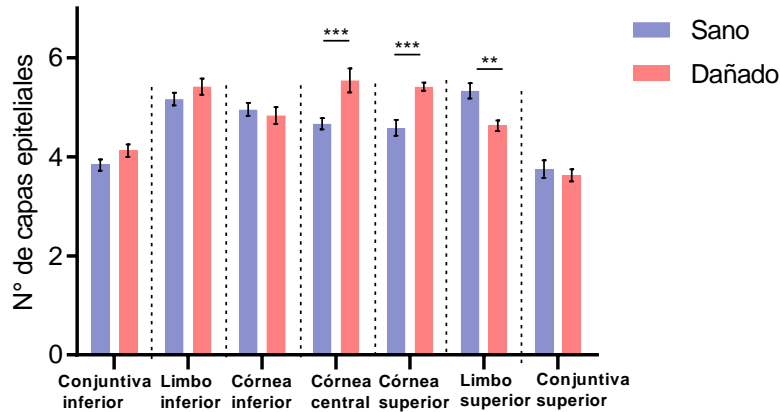


Figura 7. Cuantificación del número de capas de células epiteliales en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado) (media ± desviación típica). **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

En el caso de las células caliciformes (cc) propias de la conjuntiva, como era de esperar, se observó una gran cantidad de las mismas en la conjuntiva inferior y superior de los tejidos sanos (15-30 cc); mientras que en limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior y limbo superior no se observaron. Por otro lado, en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares se observó una presencia significativamente menor de células caliciformes en la conjuntiva inferior y superior (5-12 cc) que en los tejidos sanos y se observó la presencia de células caliciformes tanto en la córnea superior (1-3 cc), como en el limbo superior (2-12 cc) (Figuras 6 y 8). En limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior y limbo superior no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

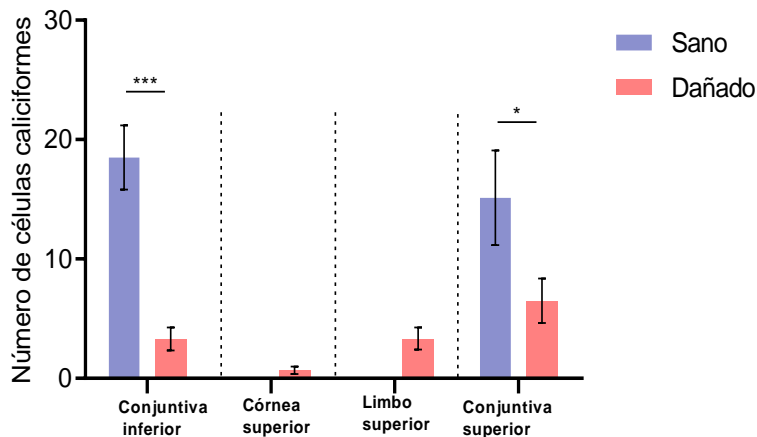


Figura 8. Cuantificación del número de células caliciformes presentes en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado) (media ± desviación típica). *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

Para llevar a cabo el análisis de la presencia o ausencia de vasos sanguíneos, se asignaron valores de 1 o 0, respectivamente, en función de si se observó presencia o ausencia de los mismos en el estroma de los tejidos. La conjuntiva inferior, el limbo inferior, el limbo superior y la conjuntiva superior de los tejidos sanos y de los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares mostraron, como era de esperar, presencia de vasos sanguíneos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales. Además, no se observaron vasos sanguíneos en el estroma de ninguna de las tres zonas corneales analizadas

de los tejidos sanos, a diferencia de lo observado en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares, los cuales presentaron vasos sanguíneos, mostrando diferencias altamente significativas entre ambos grupos experimentales (Figuras 6 y 9).

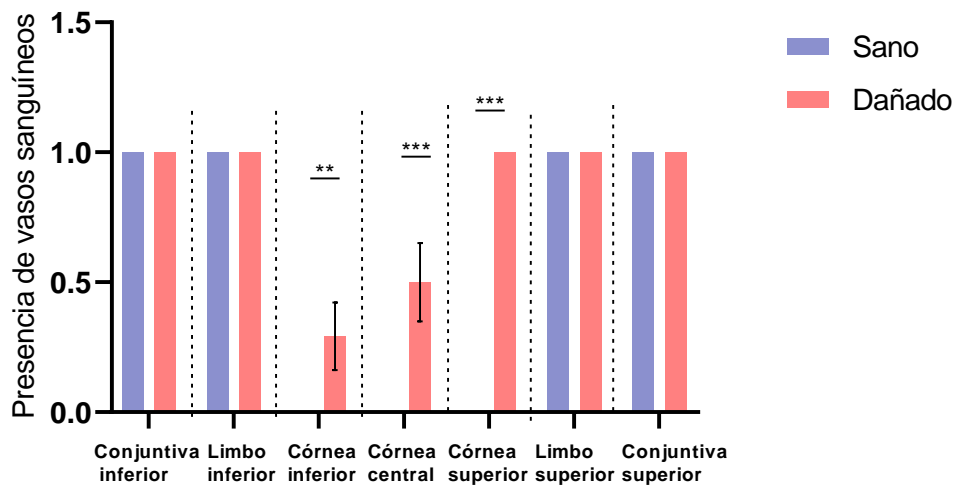


Figura 9. Análisis de la presencia/ausencia de vasos sanguíneos en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado) (media \pm desviación típica). **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Al igual que en el análisis de la presencia de vasos sanguíneos, para realizar el análisis de la presencia o ausencia de mucina en la superficie epitelial de los tejidos analizados, se asignaron valores de 1 y 0, respectivamente, según si presentaban o no una capa de mucina teñida de color fucsia en su superficie epitelial. La conjuntiva inferior, el limbo inferior y la conjuntiva superior de los tejidos sanos y de los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron una capa de mucina sobre las células epiteliales, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figuras 6 y 10). La córnea inferior y superior de algunos tejidos sanos presentaron una fina capa de mucina en su superficie, mientras que la córnea central carecía de ésta. Por otro lado, los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron diferencias significativas en la córnea central, córnea superior y limbo superior en comparación con los tejidos sanos (Figuras 6 y 10).

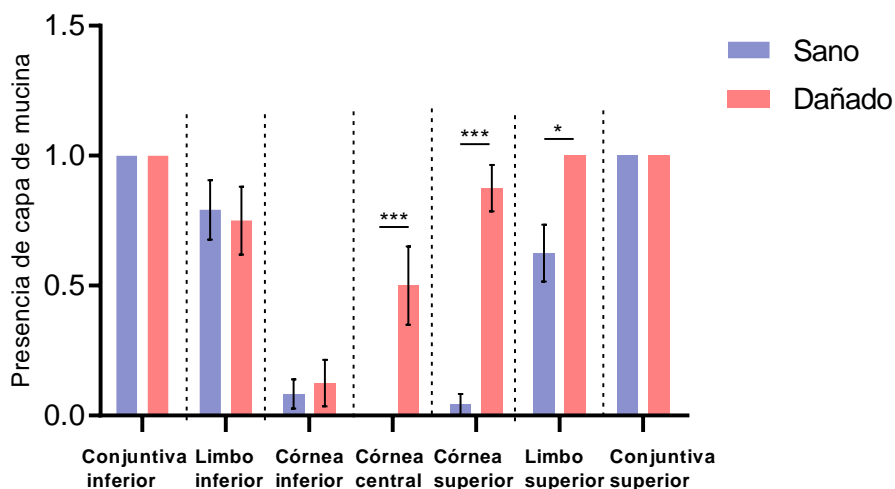


Figura 10. Análisis de la presencia/ausencia de mucina en la superficie epitelial en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado) (media \pm desviación típica). *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

Para realizar la semicuantificación de las células inflamatorias presentes en el estroma de los tejidos oculares se utilizó la escala de valoración descrita en materiales y métodos. En los tejidos sanos, como era de esperar, no se observó presencia de infiltrados inflamatorios en ninguna de las tres zonas corneales, pero sí en la conjuntiva inferior, el limbo inferior, el limbo superior y la conjuntiva superior, los cuales presentaron una baja cantidad de infiltrados inflamatorios en el estroma de los mismos (Figuras 6 y 11). Los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron muy baja cantidad de infiltrados inflamatorios en la conjuntiva inferior, limbo inferior, cornea inferior y cornea central, pero se observó una cantidad moderada de células inflamatorias en la córnea superior y una cantidad muy elevada en limbo superior y la conjuntiva superior, mostrando diferencias significativas en la córnea central, córnea superior, limbo superior y conjuntiva superior entre ambos grupos experimentales (Figuras 6 y 11).

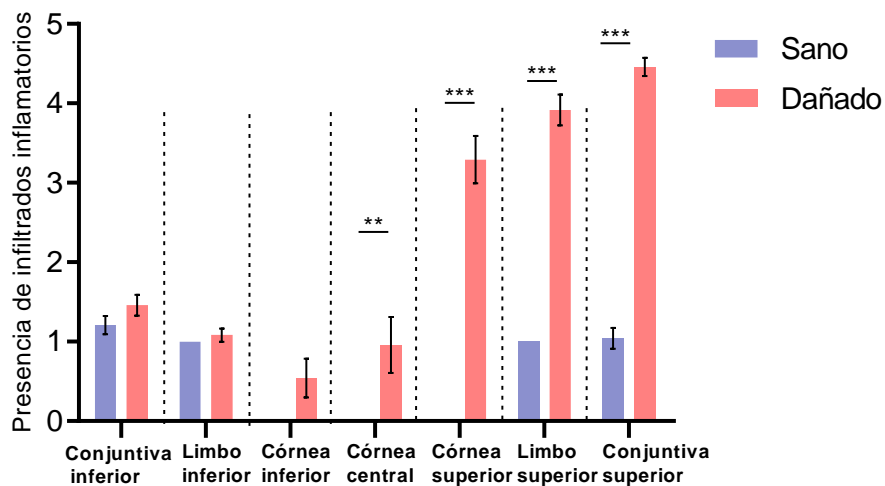


Figura 11. Semicuantificación de la presencia de infiltrados inflamatorios en el estroma de tejidos oculares sanos (sano) y de tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañados) (media \pm desviación típica). **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

6.2. Determinación de los niveles de expresión de los marcadores de epitelio corneal y limbar.

Se realizaron ensayos de inmunodetección mediante inmunofluorescencia para determinar los niveles de expresión de los marcadores de epitelio corneal (CK3 y E-Cad) y limbar (P63 y CK15) en los tejidos oculares sanos y en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares. Las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia fueron analizadas utilizando el programa ImageJ, tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos. El primer marcador analizado fue la CK3, la cual es una proteína de citoesqueleto que se expresa en las células del epitelio corneal. La expresión de este marcador se observó principalmente en el citoplasma de la capa más superficial de células del epitelio corneal inferior, central y superior, tanto en los tejidos sanos como en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares, identificándose en las imágenes con un color verde intenso. En el epitelio del limbo inferior y superior de ambos grupos experimentales se observó menor intensidad de fluorescencia en relación a la observada en las tres zonas corneales (Figura 12).

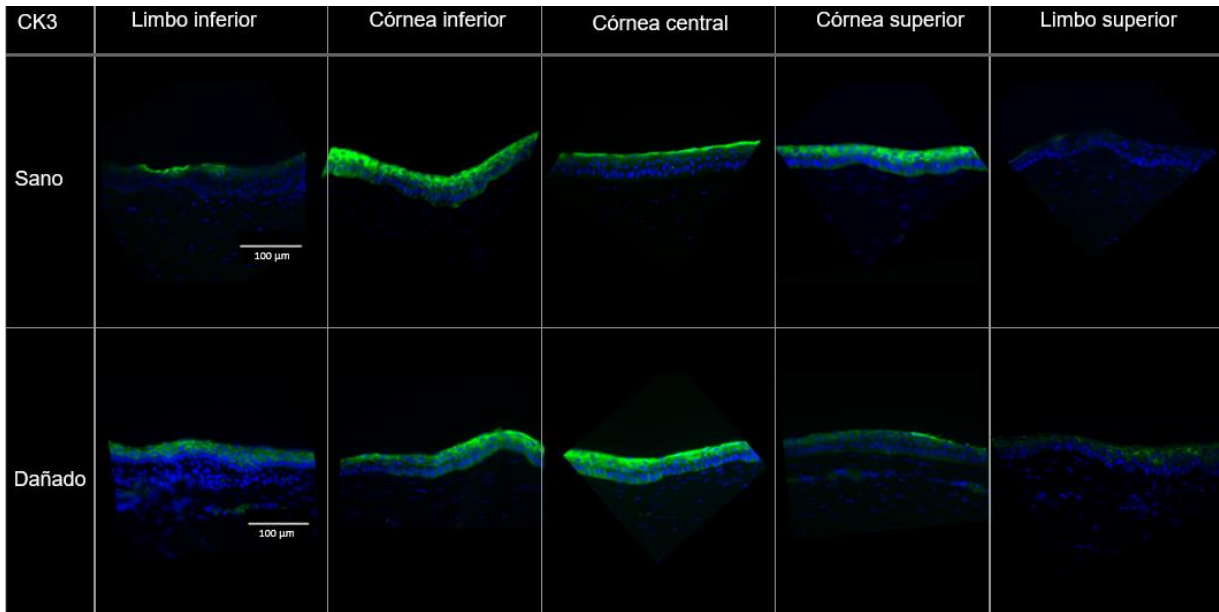


Figura 12. Imágenes de inmunofluorescencia frente al marcador de epitelio corneal citoqueratina 3 (CK3) en tejidos sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado). En las imágenes se puede observar en verde la presencia de la proteína CK3 y en azul los núcleos teñidos con Hoechst (colorante fluorescente de ADN). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala:100 μm .

En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en el limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior y limbo superior, entre los grupos experimentales. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre la conjuntiva inferior y superior en relación a la córnea central en ambos grupos experimentales. Tanto los tejidos sanos, como los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron niveles de expresión del marcador de epitelio corneal CK3 similares en las zonas del limbo y la córnea y una menor expresión de este marcador en ambas conjuntivas con respecto a la expresión observada en el resto de zonas de tejido (Figura 13).

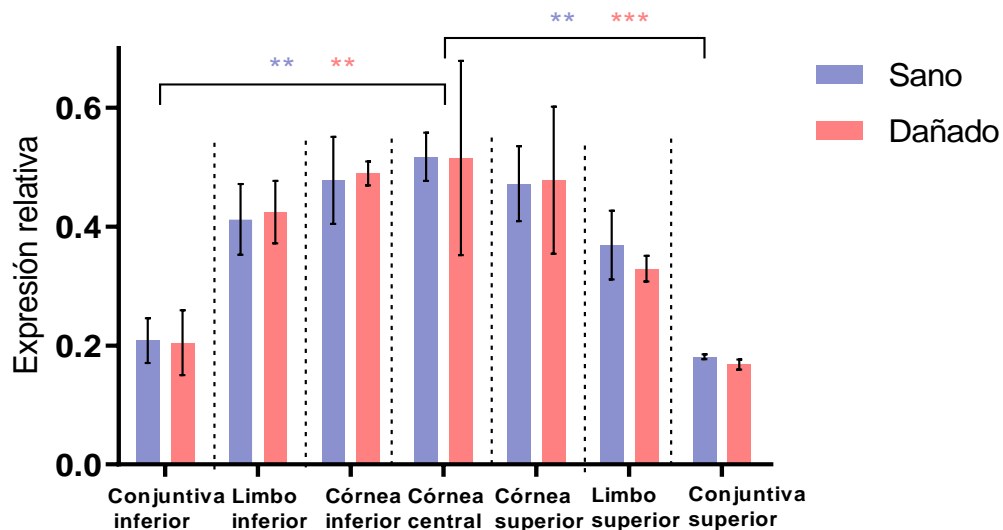


Figura 13. Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio corneal citoqueratina 3 (CK3) en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañados) (media \pm desviación típica). **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

La E-Cadherina, al igual que CK3, se expresó en las células del epitelio corneal inferior, central y superior, tanto en los tejidos sanos, como en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares, pudiéndose identificar en las imágenes con un color verde intenso (Figura 14). En el limbo inferior y superior de ambos grupos experimentales se observó menor intensidad de fluorescencia en relación con la observada en las tres zonas corneales (Figura 14).

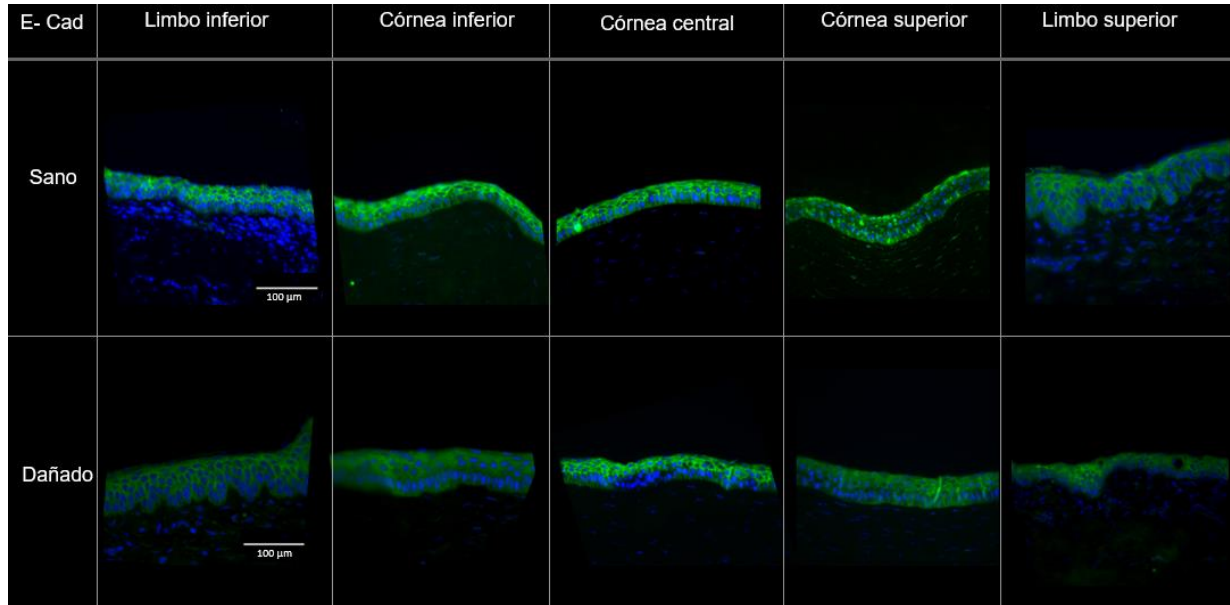


Figura 14. Imágenes de inmunofluorescencia frente al marcador de epitelio corneal E-cadherina (E-Cad) en tejidos sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado). En las imágenes se puede observar en verde la presencia de la proteína E-Cad y en azul los núcleos teñidos con Hoechst (colorante fluorescente de ADN). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala:100 µm.

Tanto los tejidos sanos, como los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron niveles de expresión del marcador de epitelio corneal E-Cad similares en las diferentes zonas del tejido (Figura 15). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales.

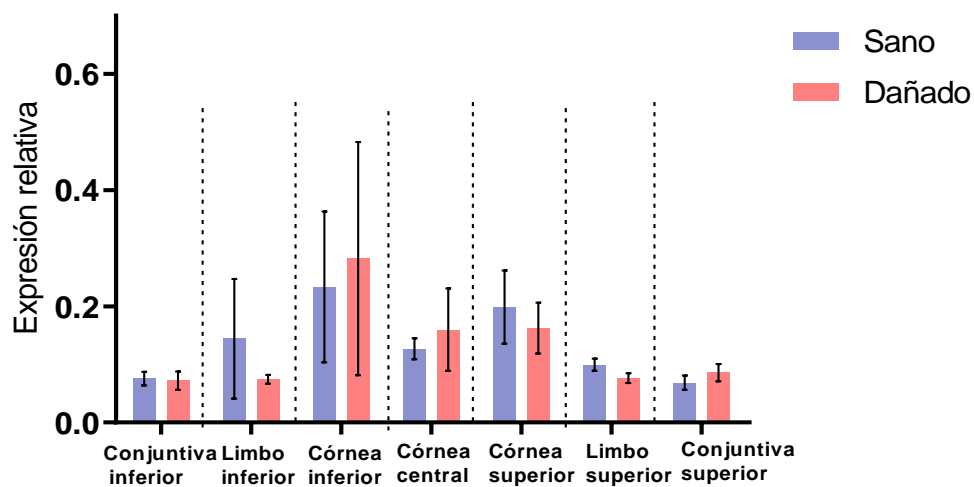


Figura 15. Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio corneal E-Cadherina en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañados) (media \pm desviación típica).

P63 es una proteína que se expresa en los núcleos de las células epiteliales del estrato más basal del limbo. Como se observa en la Figura 16, su expresión se observó en los núcleos de las células epiteliales del limbo inferior de ambos grupos experimentales y en el limbo superior de los tejidos sanos, pudiéndose diferenciar en un color turquesa verdoso claro en las imágenes, debido a la sobreposición de las fluorescencias verde y azul. La córnea inferior y la córnea superior del tejido sano, junto al limbo superior en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares expresaron una cantidad muy baja casi imperceptible de este marcador. En ninguno de los grupos experimentales se observó expresión de este marcador en la córnea central, tal y como se aprecia en la Figura 16 donde se puede observar solamente la fluorescencia azul característica de fluoróforo nuclear Hoechst que tiñe los núcleos.

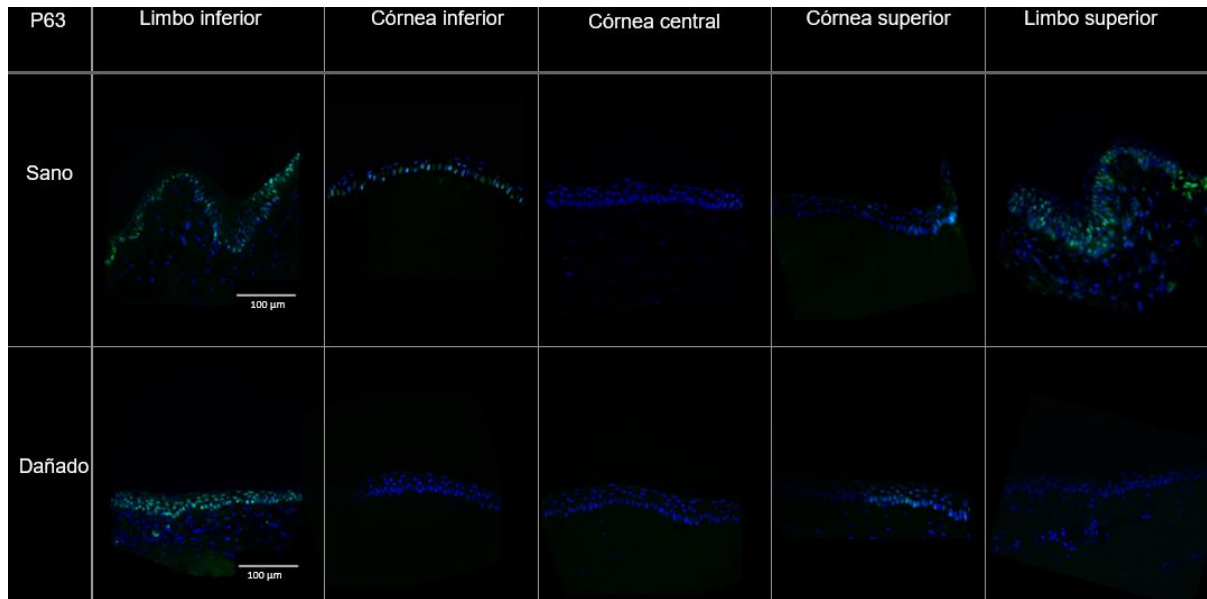


Figura 16. Imágenes de inmunofluorescencia frente al marcador de epitelio limbar P63 en tejidos sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado). En las imágenes se puede observar en turquesa verdoso claro la presencia de la proteína P63 y en azul los núcleos teñidos con Hoechst (colorante fluorescente de ADN). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala:100 µm.

El análisis de los datos reveló que los tejidos sanos y los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron niveles de expresión del marcador de epitelio limbar P63 muy similares en las diferentes zonas del tejido, por lo que no se observaron diferencias significativas entre ellos a excepción del limbo superior, donde la expresión de este marcador fue significativamente menor en los tejidos dañados que en los tejidos sanos. Con el análisis estadístico también se determinó que había diferencias significativas entre el limbo inferior y la conjuntiva inferior, la córnea inferior, central, superior y la conjuntiva superior en ambos grupos experimentales (Figura 17).

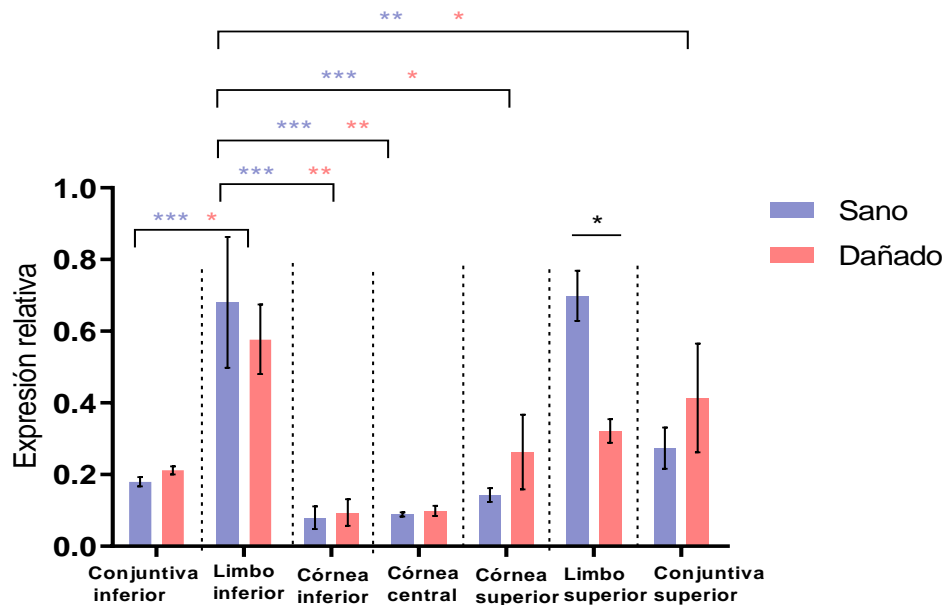


Figura 17: Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio limbar P63 en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañados) (media \pm desviación típica). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

La CK15 es una proteína de citoesqueleto que se expresa en las células del epitelio limbar. En la Figura 18 se observa un color verde intenso correspondiente a la expresión de este marcador en el limbo inferior y superior de los tejidos sanos y en el limbo inferior de los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares. En la córnea inferior y superior se observó fluorescencia con menor intensidad en ambos grupos experimentales, mientras que, en la córnea central y en el limbo superior en los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares, así como en la córnea central del tejido sano la fluorescencia fue casi imperceptible, observándose solo los núcleos en color azul debido a su tinción con el fluoróforo nuclear Hoechst (Figuras 18).

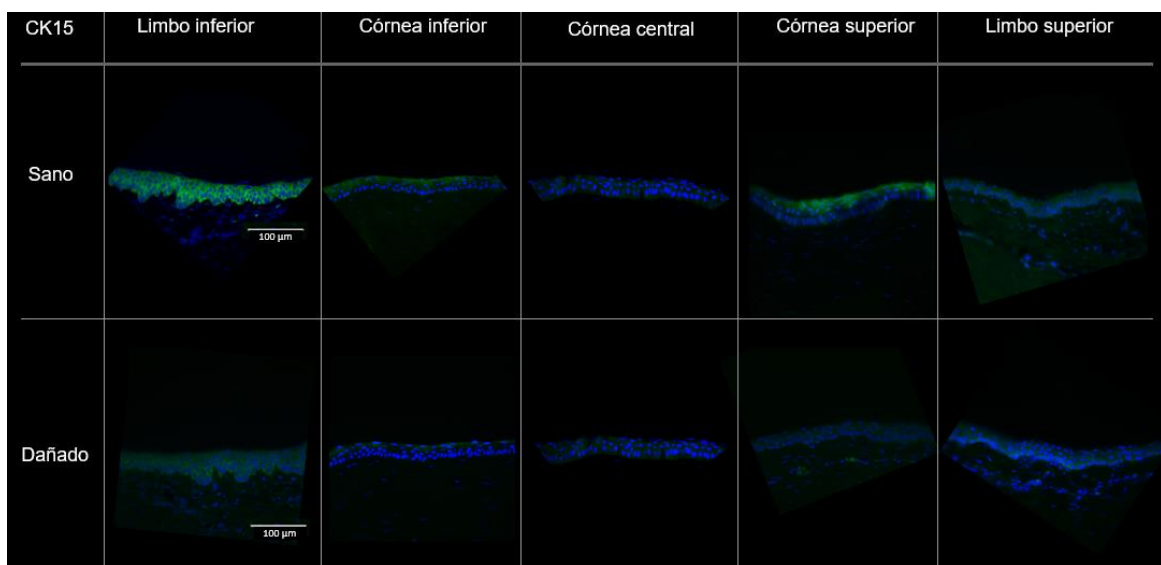


Figura 18. Imágenes de inmunofluorescencia frente a CK15 en tejidos sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañado). En las imágenes se puede observar en verde la presencia de la proteína CK15 y en azul los núcleos teñidos con Hoechst (colorante fluorescente de ADN). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala: 100 μm .

Como era de esperar, los análisis estadísticos demostraron que la CK15 se expresaba en mayor cantidad en el limbo inferior y superior en los tejidos sanos, encontrándose diferencias significativas en relación con la conjuntiva inferior, córnea inferior, central, superior y conjuntiva superior (Figura 19). Los análisis también mostraron que había diferencias significativas en la expresión de la CK15 en el limbo inferior y superior de los tejidos sanos y de los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (Figura 19).

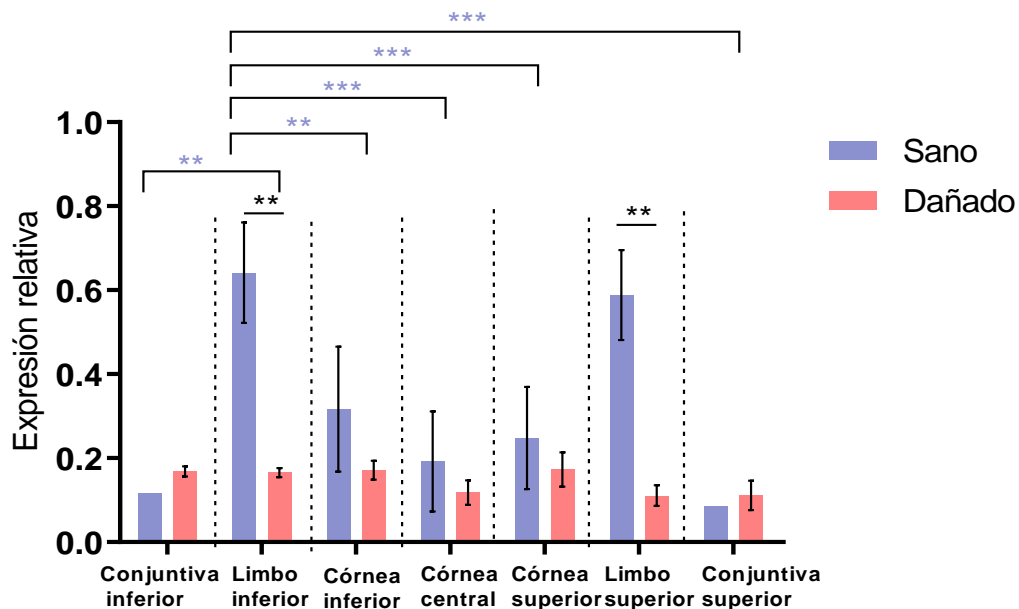


Figura 19. Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio limbar CK15 en tejidos oculares sanos (sano) y en tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares (dañados) (media \pm desviación típica). **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

7. DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades corneales son la cuarta causa de pérdida de la visión después de las cataratas, el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad, afectando a más de 10 millones de personas en todo el mundo [32, 43, 44]. De ellas, se estima que alrededor del 50% tendrá ceguera corneal debida a una LSCD. Los pacientes con LSCD son malos candidatos al trasplante de córnea y, de hecho, constituyen fracasos sistemáticos, ya que el epitelio del injerto donante, una vez agotado, no tiene posibilidades de regenerarse al no existir un limbo sano [32] Pese a que el trasplante de limbo cultivado (CLET) representa uno de los primeros y más exitosos éxitos de la medicina regenerativa, este tratamiento no exento de limitaciones tales como la baja disponibilidad de tejido limbar donante y la necesidad de inmunosupresión en el caso de realizar trasplantes alogénicos [23, 33]. Por estos motivos, numerosos grupos de investigación llevan años trabajando en la búsqueda de nuevas y mejores soluciones terapéuticas para esta patología. Entre ellas, la investigación de nuevas terapias basadas en células ha incrementado de manera exponencial en los últimos años, proponiendo nuevas e innovadoras alternativas terapéuticas que deben ser en primer lugar evaluadas en modelos animales antes de poder dar el salto a ser probadas en humanos [23]. Por todas estas razones, es necesario desarrollar modelos animales de LSCD que imiten los rasgos patológicos de esta enfermedad, con los cuales se puedan evaluar la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos.

En la actualidad, existen varios modelos experimentales de LSCD que se realizan mediante quemaduras química del limbo. En algunos de estos modelos, además de la quemadura se realiza un raspado de los restos epiteliales, pero no siempre se eliminan por completo las células madre limbares [23, 32, 43]. Otro de los modelos de LSCD consiste en la eliminación quirúrgica del limbo (limbectomía), junto a una quemadura corneal [23, 32]. Los modelos de LSCD más utilizados en investigación son modelos que tienen los 360° del limbo afectado o modelos con LSCD totales. Sin embargo, el limbo no siempre se ve afectado de manera total, en ocasiones el daño se produce de forma parcial y existen pocos estudios enfocados a estos modelos y, por lo tanto, pocos tratamientos dirigidos a ellos [4, 23, 45].

Los conejos blancos de Nueva Zelanda fueron utilizados para el estudio histológico y fenotípico de un modelo experimental de deficiencia parcial de células madre limbares, debido al parecido del diámetro corneal que tienen los conejos blancos al de los humanos ($13,41 \pm 0,34$ mm frente a $11,71 \pm 0,42$ mm). Además, la visibilidad de las estructuras oculares durante los procedimientos quirúrgicos es buena y el desarrollo del ojo del conejo Nueva Zelanda se da de manera comparable al de los humanos [46, 47]. A nivel histológico, la estructura de la córnea del conejo es similar a la de la córnea humana, diferenciándose entre sí únicamente en las proporciones de las diferentes capas, y en que la capa de Bowman en los conejos es rudimentaria [14]. En los animales de que se obtuvieron los tejidos analizados en este trabajo el daño se realizó en el globo ocular derecho mediante desepitelización completa de la córnea con n-heptanol, seguida de una limbectomía quirúrgica de los 180° del limbo (limbo superior y parte del limbo temporal, de VII a I según los husos horarios).

El estudio histológico mostró que las características de la conjuntiva, limbo y córnea de los tejidos sanos, presentaron valores dentro de los parámetros conocidos a nivel bibliográfico, por lo que este grupo fue tomado en cuenta como control [4, 48]. Por otro lado, los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron diferencias significativas en relación al grupo control. Se observó un aumento de capas epiteliales en la córnea central y superior, sugiriendo que la ausencia parcial de células madre limbares en la zona del limbo superior provocó que la conjuntiva superior invadiera la córnea y, como consecuencia, se viera incrementado el número de capas epiteliales en estas zonas [49, 50]. Estos resultados concuerdan con los publicados en 2006 por Kethiri A, et al., los cuales observaron el mismo fenómeno en un modelo de LSCD desarrollado en conejos. [49, 50]. Por otro lado, el limbo superior, el cual fue dañado, presentó una disminución de capas epiteliales, lo cual es inconsistente con los resultados obtenidos por Ma Y., et al., quienes, por el contrario, mostraron que hubo un aumento en el número de capas epiteliales [51]. Los resultados obtuvimos pudieron darse debido a que durante la limbectomía quirúrgica, se trata de eliminar por completo todas o casi todas las capas del epitelio limbar, por lo que el epitelio conjuntival que invade la zona limbar sometida a daño no tiene tantas capas como el epitelio limbar sano. En los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares también se observó la presencia de células calciformes y una capa de mucina en la córnea y limbo superiores, esto coincide con lo observado por López-García J., et al., quienes realizaron un estudio en personas con insuficiencia límbica grave y observaron que en todos los pacientes la presencia de células calciformes y una fina capa de mucina en el limbo y córnea [52]. La disminución de las células calciformes observada en la conjuntiva tanto superior como e inferior de los tejidos dañados en comparación con el número de células calciformes presente en los tejidos sanos podría ser consecuencia de la causticación inicial con n-heptanol a la que fueron sometidos los tejidos. En este sentido, existen publicaciones en las que describen que en quemaduras corneales puede no observarse la aparición de células calciformes en los tejidos corneales [49]. La LSCD parcial se caracteriza por una conjuntivalización incompleta de la superficie de la córnea, es decir, la

superficie corneal no está conjuntivalizada por completo y una parte del limbo aun funciona de manera parcial [53].

Los pacientes con LSCD presentan defectos epiteliales corneales como neovascularización y opacidad corneal, enrojecimiento conjuntival, lagrimeo, episodios recurrentes de dolor, inflamación crónica y finalmente pérdida de la visión, debido a la invasión de la conjuntiva [35]. Nuestros resultados mostraron que los tejidos sanos no presentaron vasos sanguíneos en la córnea, pero sí en los tejidos con deficiencia parcial donde se observó la presencia de vasos sanguíneos en la zona corneal. De la misma manera, a diferencia de los tejidos sanos, se observó la presencia de infiltrados inflamatorios en la córnea, limbo y conjuntiva superiores de los tejidos con LSCD, es decir, en las áreas cercanas a la zona de generación del daño. Estos resultados confirman los mostrados en otros estudios con modelos de LSCD en conejos, los cuales observaron vascularización en el estroma corneal, además inflamación severa [56]. La gravedad de la lesión ocular en los modelos utilizados depende del grado de penetración del n-heptanol, el daño puede resultar en necrosis de la superficie ocular, infiltración leucocitaria o inflamación prolongada del epitelio, así como de los tejidos estromales [35, 53].

Para el estudio fenotípico, se realizó un análisis inmunohistoquímico de los marcadores de epitelio corneal CK3 y E-Cad, y los marcadores de epitelio limbar P63 y CK15. Aunque la CK3 es un marcador de epitelio corneal, en ocasiones se expresa en el epitelio limbar de las capas suprabasales en conejos, como fue en este caso, en donde los tejidos sanos y los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares no presentaron diferencias significativas entre ellos, y tampoco hubo diferencia entre la zona limbar y corneal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Reinshagen H., et al., los cuales observaron que la CK3 se expresó tanto en córnea como en limbo en un modelo con deficiencia de células madre [13, 57].

La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana presente en las uniones intercelulares de las células epiteliales, y que interactúa con el citoesqueleto celular a través de otras proteínas como las cateninas [58]. El análisis de los niveles de expresión de este marcador en los tejidos epiteliales de la superficie ocular de las muestras analizadas mostró que no había diferencias significativas entre los grupos experimentales, ni tampoco entre las zonas corneales y limbares de ambos grupos experimentales. No obstante, el análisis de los datos mostró que había una ligera diferencia en la intensidad de fluorescencia de la zona corneal con respecto a la limbar, aunque estas diferencias no fueron suficientes como para que fueran significativas probablemente como consecuencia del bajo tamaño muestral analizado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Galindo S., et al., en 2017, quienes indicaron que la expresión de la E-cadherina no cambiaba en el modelo con deficiencia parcial de LSCD parcial con respecto al tejido sano, pero sí que se veía disminuida en el epitelio corneal de animales con LSCD total (360°) [13]. Nuestros datos sugieren, por tanto, que la ausencia de cambios significativos en la expresión de E-cadherina en los epitelios de la superficie ocular del modelo de deficiencia limbar parcial estudiado podrían ser debidos a la existencia de células madre epiteliales limbares en buen estado en la zona de limbo no dañado, las cuales podrían haber favorecido al buen mantenimiento del fenotipo del epitelio corneal [13, 58, 59].

P63 es un factor de transcripción expresado en altos niveles en las capas de células progenitoras de la piel, mama y ojos [60]. Los tejidos sanos y los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares analizados en nuestro trabajo presentaron niveles de expresión de este marcador de epitelio limbar muy similares en las diferentes zonas del tejido, excepto en el limbo superior (zona dañada) de los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares, donde se observó una disminución en la expresión relativa de P63. Las diferencias observadas en los niveles de expresión de este marcador entre el limbo inferior y la córnea inferior, central,

superior, conjuntiva inferior y superior en ambos grupos experimentales, podrían explicarse por el hecho de que el limbo inferior de nuestro modelo no estaba dañado que, por tanto, la expresión de este marcador (específico de epitelio limbar) no se vio afectada en esta zona del tejido y mostraba niveles similares a los del tejido sano. Nuestros resultados corroboran, por tanto, que parte de las células madre limbares fueron eliminadas mediante la limbectomía quirúrgica en la zona del limbo superior y confirman los resultados mostrados por otros autores en donde también confirmaron la pérdida de este marcador de células madre limbares en el desarrollo de modelos experimentales de LSCD en conejos [13, 46, 60, 61].

La CK15 es una queratina de tipo I que se expresa en las células basales del epitelio estratificado del limbo [60]. La expresión de CK15 en el epitelio limbar de los tejidos oculares sanos, como era de esperar, fue elevada, igual que lo observado con el marcador P63. Los tejidos sanos y los tejidos con deficiencia parcial de células madre limbares presentaron niveles de expresión de los marcadores de epitelio limbar muy similares en las diferentes zonas del tejido, a excepción de las zonas del limbo, tanto el limbo inferior como superior en donde se observó una disminución de su expresión en los tejidos con daño parcial. La expresión observada en el limbo superior (zona dañada) coincide con los resultados de varios estudios que muestran una disminución significativa de este marcador en tejidos con daño limbar [60]. Sin embargo, los resultados obtenidos en el limbo inferior de los tejidos con deficiencia limbar parcial no coinciden con los mostrados por Yoshida S., et al., quienes indicaron que un limbo en buen estado presenta una mayor expresión de CK15 que la de los tejidos corneales y conjuntivales [62]. La baja expresión de CK15 en la zona del limbo inferior (no dañada) de los conejos con deficiencia limbar parcial podría quizás explicarse por un aumento de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales de esta zona con el objetivo de reparar el epitelio corneal dañado como consecuencia de la ausencia de células madre epiteliales en el limbo superior. La diferenciación de las células madre epiteliales limbares provoca cambios en los patrones de expresión de las citoqueratinas, por lo que la expresión de la CK15, específica de células más indiferenciadas, podría haberse visto disminuida a causa de un proceso de diferenciación [63].

En conjunto, nuestros resultados muestran que las características histológicas y fenotípicas de la superficie ocular del modelo experimental de deficiencia parcial de células madre limbares estudiado en este trabajo son relativamente similares a las características que describen esta misma enfermedad en humanos. Por tanto, este modelo sería válido para evaluar la seguridad y la eficacia de nuevas terapias avanzadas destinadas al tratamiento de esta enfermedad.

8. CONCLUSIONES

- La superficie ocular del modelo experimental de deficiencia parcial de células madre de limbo estudiado presenta diferencias significativas a nivel histológico y a nivel fenotípico con la superficie ocular de los ojos sanos, siendo estas diferencias especialmente notorias en las zonas cercanas al limbo dañado.
- El estudio bibliográfico verificó que las características histológicas y fenotípicas de la superficie ocular del modelo de deficiencia limbar parcial estudiado son similares a las mostradas por otros modelos experimentales publicados y se asemejan, además, a las presentadas por la enfermedad en seres humanos.

- El modelo de deficiencia parcial de células madre de limbo desarrollado en conejo que ha sido estudiado en este trabajo es un modelo válido para evaluar la seguridad y la eficacia de nuevas terapias avanzadas destinadas al tratamiento de esta enfermedad en humanos.

9. LIMITACIONES

Este trabajo tiene una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar las conclusiones obtenidas:

- Las valoraciones de la presencia de mucina en la superficie epitelial y de vasos sanguíneos e infiltrados inflamatorios en el tejido estroma fueron subjetivas. Pese a que se analizaron varios cortes seriados de tres niveles de profundidad diferentes, el análisis fue realizado por un solo observador. En futuros análisis sería recomendable que estas valoraciones se llevaran a cabo por más de un investigador con el fin de incrementar la precisión de los resultados y evitar posibles sesgos.
- El número de muestras tisulares analizadas de cada grupo experimental fue pequeño (n=4). Para conseguir resultados con significancia estadística, especialmente en los estudios del inmunofenotipo, se debería aumentar el tamaño muestral de cada grupo experimental.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Steger B (2021) Ocular surface angiography: from neovessels to neoplasia. *BMJ Open Ophthalmology* 6:e000829. <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2021-000829>
2. Knop E, Knop N (2007) Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy* 92:36–49. <https://doi.org/10.1159/000099252>
3. ttsy, iStock by Getty Images. Conjuntivitis. Sección Vertical y vista externa de los ojos humanos. <https://www.istockphoto.com/es/vector/conjuntivitis-sección-vertical-y-vista-externa-de-los-ojos-humanos-gm684810440-125869641>. Accessed 25 Jun 2022
4. Collin J, Queen R, Zerti D, Bojic S, Dorgau B, Moyse N, Molina MM, Yang C, Dey S, Reynolds G, Hussain R, Coxhead JM, Lisgo S, Henderson D, Joseph A, Rooney P, Ghosh S, Clarke L, Connon C, Haniffa M, Figueiredo F, Armstrong L, Lako M (2021) A single cell atlas of human cornea that defines its development, limbal progenitor cells and their interactions with the immune cells. *Ocul Surf* 21:279–298. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.03.010>
5. Vellara HR, Patel D v (2015) Biomechanical properties of the keratoconic cornea: a review. *Clin Exp Optom* 98:31–8. <https://doi.org/10.1111/cxo.12211>
6. Schwarz W (1972) Cornea. In: *Cornea*. J.F. Bergmann-Verlag, Munich, pp 12–18
7. Sridhar MS (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 66:190–194. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_646_17
8. Área Oftalmológica Avanzada. (2019) Densidad de células endoteliales. <https://areaoftalmologica.com/terminos-de-oftalmologia/densidad-de-celulas-endoteliales/>. Accessed 25 Jun 2022
9. Rocha-de-Lossada C, Torras-Sanvicens J, Peraza-Nieves J (2020) Corneal epithelial cells division assessed by scanning electron microscopy. *Indian J Ophthalmol* 68:2252. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1214_20
10. Okumura N, Koizumi N (2020) Regeneration of the Corneal Endothelium. *Curr Eye Res* 45:303–312. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1700529>
11. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Pfeiffer N, Gericke A (2021) Corneal Epithelial Stem Cells-Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Options. *Cells* 10:2302. <https://doi.org/10.3390/cells10092302>

12. Paulsen F (2008) Functional Anatomy and Immunological Interactions of Ocular Surface and Adnexa. *Surgery for the Dry Eye* 41:21–35. <https://doi.org/10.1159/000131068>
13. Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, Rey E, de la Mata A, Plata-Cordero M, Calonge M, Nieto-Miguel T (2017) Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage. *Stem Cells* 35:2160–2174. <https://doi.org/10.1002/stem.2672>
14. Wilson SE (2020) Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration. *Exp Eye Res* 195:108033. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108033>
15. Meek KM, Knupp C (2015) Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research* 49:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.001>
16. Lewis PN, Pinali C, Young RD, Meek KM, Quantock AJ, Knupp C (2010) Structural Interactions between Collagen and Proteoglycans Are Elucidated by Three-Dimensional Electron Tomography of Bovine Cornea. *Structure* 18:239–245. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.11.013>
17. Branch MJ, Hashmani K, Dhillon P, Jones DRE, Dua HS, Hopkinson A (2012) Mesenchymal Stem Cells in the Human Corneal Limbal Stroma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:5109. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8673>
18. Zaki AA, Elalfy MS, Said DG, Dua HS (2015) Deep anterior lamellar keratoplasty - Triple procedure: A useful clinical application of the pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Eye (Basingstoke)* 29:323–326. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.273>
19. Seyed-Safi AG, Daniels JT (2020) The limbus: Structure and function. *Experimental Eye Research* 197:108074. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108074>
20. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J (2008) Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 31:53. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272008000100005>
21. Thoft RA, Friend J (1983) The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1442–3
22. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SC (2007) Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research* 17:26–36. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310137>
23. Calonge M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M (2021) Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency. *Pharmaceutics* 13:1483. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091483>
24. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Du Y (2016) Stem Cells in the Limbal Stroma. *Ocul Surf* 14:113–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2015.12.006>
25. Gascón M (2008) Desarrollo del sistema de cohesión intercelular en el epitelio corneal humano generado por ingeniería tisular. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1890/17466210.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accessed 18 Jun 2022
26. Zhao L, Jia Y, Zhao C, Li H, Wang F, Dong M, Liu T, Zhang S, Zhou Q, Shi W (2020) Ocular surface repair using decellularized porcine conjunctiva. *Acta Biomater* 101:344–356. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.006>
27. Saornil MA, Becerra E, Méndez MC, Blanco G (2009) Tumores de la conjuntiva. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 84:07–22. <https://doi.org/10.4321/S0365-66912009000100003>
28. Nichols BA (1996) Conjunctiva. *Microscopy Research and Technique* 33:296–319. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960301\)33:4<296::AID-JEMT2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<296::AID-JEMT2>3.0.CO;2-O)
29. Robertson SYT, Roberts JS, Deng SX (2021) Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Importance of the Niche. *Int J Mol Sci* 22:11975. <https://doi.org/10.3390/ijms222111975>
30. Le Q, Xu J, Deng SX (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 16:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.11.002>
31. Oliva J, Bardag-Gorce F, Niihara Y (2020) Clinical Trials of Limbal Stem Cell Deficiency Treated with Oral Mucosal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 21:411. <https://doi.org/10.3390/ijms21020411>

32. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, de Luca M, Pellegrini G (2010) Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *New England Journal of Medicine* 363:147–155. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955>
33. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, Calonge M (2015) Stem Cell Therapy for Corneal Epithelium Regeneration following Good Manufacturing and Clinical Procedures. *Biomed Res Int* 2015:408495. <https://doi.org/10.1155/2015/408495>
34. Ganger A, Singh A, Kalaivani M, Gupta N, Vanathi M, Mohanty S, Tandon R (2021) Outcomes of surgical interventions for the treatment of limbal stem cell deficiency. *Indian Journal of Medical Research* 154:51. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1139_18
35. Barut Selver Ö, Yağcı A, Eğrilmez S, Gürdal M, Palamar M, Çavuşoğlu T, Ateş U, Veral A, Güven Ç, Wolosin JM (2017) Limbal Stem Cell Deficiency and Treatment with Stem Cell Transplantation. *Turk J Ophthalmol* 47:285–291. <https://doi.org/10.4274/tjo.72593>
36. Jackson CJ, Myklebust Ernø IT, Ringstad H, Tønseth KA, Dartt DA, Utheim TP (2020) Simple limbal epithelial transplantation: Current status and future perspectives. *Stem Cells Transl Med* 9:316–327. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0203>
37. López-Paniagua M, de la Mata A, Galindo S, Blázquez F, Calonge M, Nieto-Miguel T (2021) Advanced Therapy Medicinal Products for the Eye: Definitions and Regulatory Framework. *Pharmaceutics* 13:347. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030347>
38. Nieto-Miguel T, Galindo S, López-Paniagua M, Pérez I, Herreras JM, Calonge M (2019) Cell Therapy Using Extraocular Mesenchymal Stem Cells In: Alió, J., Alió del Barrio, J., Arnalich-Montiel, F. (eds) *Corneal Regeneration. Essentials in Ophthalmology* Springer, Cham 231–262. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01304-2_17
39. Jiang T-S, Cai L, Ji W-Y, Hui Y-N, Wang Y-S, Hu D, Zhu J (2010) Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 16:1304–16
40. Xu B, Fan T-J, Zhao J, Sun A, Wang R-X, Hu X-Z, Yu H-Z, Fan X-Y, Xu X-H (2012) Transplantation of tissue-engineered human corneal epithelium in limbal stem cell deficiency rabbit models. *Int J Ophthalmol* 5:424–9. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.04>
41. Lee RH, Yu JM, Foscett AM, Peltier G, Reneau JC, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ (2014) TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16766–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416121111>
42. Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K (2007) Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:597–604. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0664>
43. Pineda R (2020) World Corneal Blindness. *Foundations of Corneal Disease* 299–305. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25335-6_25
44. Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli M v, Das A, Jonas JB, Keeffe J, Kempen JH, Leasher J, Limburg H, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Silvester A, Stevens GA, Tahhan N, Wong TY, Taylor HR, Bourne R, Ackland P, Arditi A, Barkana Y, Bozkurt B, BRAITHWAITE T, Bron A, Budenz D, Cai F, Casson R, Chakravarthy U, Choi J, Cicinelli MV, Congdon N, Dana R, Dandona R, Dandona L, Das A, Dekaris I, del Monte M, Deva J, Dreer L, Ellwein L, Frazier M, Frick K, Friedman D, Furtado J, Gao H, Gazzard G, George R, Gichuhi S, Gonzalez V, Hammond B, Hartnett ME, He M, Hejtmancik J, Hirai F, Huang J, Ingram A, Javitt J, Jonas J, Joslin C, Keeffe J, Kempen J, Khairallah M, Khanna R, Kim J, Lambrou G, Lansingh VC, Lanzetta P, Leasher J, Lim J, LIMBURG H, Mansouri K, Mathew A, Morse A, Munoz B, Musch D, Naidoo K, Nangia V, PALAIOU M, Parodi MB, Pena FY, Pesudovs K, Peto T, Quigley H, Raju M, Ramulu P, Resnikoff S, Robin A, Rossetti L, Saaddine J, SANDAR M, Serle J, Shen T, Shetty R, Sieving P, Silva JC, Silvester A, Sitorus RS, Stambolian D, Stevens G, Taylor H, Tejedor J, Tielsch J, Tsilimbaris M, van Meurs J, Varma R, Virgili G, Volmink J, Wang YX, Wang N-L, West S, Wiedemann P, Wong T, Wormald R, Zheng Y (2017) Magnitude, temporal trends, and

- projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 5:e888–e897. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30293-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30293-0)
45. Comes N, Gasull X, Callejo G (2021) Proton Sensing on the Ocular Surface: Implications in Eye Pain. *Frontiers in Pharmacology* 12:. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.773871>
 46. Rufer F, Schroder A, Erb C (2005) White-to-White Corneal Diameter. *Cornea* 24:259–261. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000148312.01805.53>
 47. Abdo M, Haddad S, Emam M (2017) Development of the New Zealand White Rabbit Eye: I. Pre- and Postnatal Development of Eye Tunics. *Anat Histol Embryol* 46:423–430. <https://doi.org/10.1111/ahe.12284>
 48. Jesus DA, Iskander DR (2017) On the methods for estimating the corneoscleral limbus. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 64:1826–1833. <https://doi.org/10.1109/TBME.2016.2624822>
 49. Fatima A, Iftekhar G, Sangwan VS, Vemuganti GK (2008) Ocular surface changes in limbal stem cell deficiency caused by chemical injury: a histologic study of excised pannus from recipients of cultured corneal epithelium. *Eye (Lond)* 22:1161–7. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702895>
 50. Kethiri AR, Singh VK, Damala M, Basu S, Rao CM, Bokara KK, Singh V (2021) Long term observation of ocular surface alkali burn in rabbit models: Quantitative analysis of corneal haze, vascularity and self-recovery. *Exp Eye Res* 205:108526. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108526>
 51. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L (2006) Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow–Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24:315–321. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0046>
 52. López-García J, Rivas L, García-Lozano I (2005) Tratamiento de la insuficiencia limbal grave mediante cirugía combinada de trasplante de limbo y trasplante de membrana amniótica. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 80:. <https://doi.org/10.4321/S0365-66912005000700005>
 53. Shanbhag SS, Chanda S, Donthineni PR, Basu S (2021) Surgical Management of Unilateral Partial Limbal Stem Cell Deficiency: Conjunctival Autografts versus Simple Limbal Epithelial Transplantation. *Clinical Ophthalmology Volume* 15:4389–4397. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S338894>