

Capítulo 4

MEDICINA REGENERATIVA: APLICACIONES EN OFTALMOLOGÍA

José Santiago López García, María Castro Rebollo, Isabel García Lozano, Eduardo Conesa Hernández

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que tiene como objetivo aportar estrategias destinadas a restaurar la función de los órganos y/o tejidos. Supone una nueva forma de terapia para pacientes con enfermedades agudas o crónicas en las que el propio organismo es incapaz de restaurar la función tisular. Se estima que en EEUU más de 60 millones de personas podrían beneficiarse de este tipo de tratamiento, ya que presenta un amplio espectro de aplicaciones clínicas en el campo de las enfermedades metabólicas, ortopédicas, cardiovasculares, hematopoyéticas, neuronales, etc. (1-6). La trascendencia de esta nueva forma de terapia ha sobrepasado los límites del debate científico y ha generado en la sociedad un importante debate ético y mediático, que ha llevado a las autoridades gubernamentales a legislar su contenido y ámbito de aplicación. En nuestro país, el Real Decreto 1301/2006 de 10 de noviembre establece, en aplicación de una directiva del Parlamento Europeo del año 2004, las normas de calidad y seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento, distribución e implantación de células y tejidos humanos, así como las normas de coordinación y funcionamiento. En este mismo Real Decreto se establecen tres tipos de establecimientos sanitarios: centros de obtención, centros de procesamiento, almacenamiento y distribución, y centros o unidades de aplicación.

FUNDAMENTOS DE LA MEDICINA REGENERATIVA

La medicina regenerativa está basada en la simulación de los mecanismos biológicos necesarios para la regeneración tisular. Estos mecanismos son intrínsecos a los tejidos y su conocimiento es básico para el desarrollo de este tipo de terapia, precisando del

esfuerzo conjunto de profesionales pertenecientes a varias disciplinas como medicina, biología, química, ingeniería, etc.

Fisiológicamente existen tres mecanismos de regeneración tisular:

– **Hiperplasia compensadora** mediante el aumento de mitosis para mantener o restaurar la masa tisular, como hacen las células hepáticas y las células β del páncreas (7).

– **Activación de células madre** con producción de células progenitoras, maduración y diferenciación de éstas. Es la forma de regeneración de los epitelios, los endotelios, el tejido conectivo y las células hematopoyéticas.

– **Producción de células madre por dediferenciación de células adultas**, un mecanismo por el cual las células adultas pierden sus características fenotípicas y se transforman en células madre, recuperando parte del potencial biológico que tenían. Este es un mecanismo común de regeneración en algunas especies de anfibios (8), pero desconocido en humanos hasta que en el año 2007 el científico japonés Shinya Yamanaka revolucionó la medicina regenerativa al obtener la clave para desbloquear e invertir el curso biológico de las células adultas humanas y conseguir, con la ayuda de cuatro factores de transcripción, convertir células adultas en células madre pluripotenciales, denominadas células madre de tercera generación o iPS (células madre inducidas), tan versátiles como las células madre embrionarias (9,10). Estos mecanismos de dediferenciación están íntimamente relacionados con los mecanismos que promueven la oncogénesis, jugando el factor p53 un importante papel en ambos procesos, y siendo este carácter oncogénico el principal factor limitante para la utilización clínica de estas células (11). En un trabajo reciente, investigadores de la Universidad de Stanford han conseguido, con la ayuda de tres factores de transcripción (Asc11, Brn2 y Myt11), transformar fibroblastos en neuronas sin necesidad de pasar por la fase de célula madre y, por tanto, con un

menor riesgo oncogénico (12). Éstas son las llamadas iN (neuronas inducidas) y abren una nueva vía de obtención de células gracias a la transformación de células adultas.

Ante una agresión o pérdida tisular, el organismo va a responder con un proceso de restauración del tejido afectado. Esta restauración puede dar como resultado un tejido con distinta arquitectura, función y propiedades al tejido original, proceso conocido como reparación o, por el contrario, la restauración puede originar un tejido similar al original, denominándose en este caso regeneración (fig. 1). Las técnicas de medicina regenerativa van encaminadas a procurar la regeneración tisular guiada. La capacidad de regeneración es intrínseca al propio tejido y sus mecanismos son similares en casi todos ellos, precisando unos sistemas de anclaje, que sirven de guía a las células, y de unas señales reguladoras del metabolismo que forman parte del denominado microambiente tisular y que controlan los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular así como la formación de matriz extracelular.

Los fibroblastos juegan un papel primordial en estos procesos de reparación tisular. Son las células más comunes y menos especializadas del tejido conectivo. Su gran capacidad para diferenciarse a otros fenotipos celulares más especializados ha sido ampliamente utilizada en medicina regenerativa (12,13). Los fibroblastos son los responsables de la formación de la matriz extracelular, una estructura imprescindible para mantener la integridad del tejido conectivo y que proporciona un soporte, en forma de entramado, que resulta fundamental en la reparación de las heridas. Estas células sintetizan todos los elementos que integran la matriz extracelular como

colágeno (sobre todo colágeno tipo 1), proteoglicanos y glucosaminoglicanos de la sustancia amorfa, proteínas fibrosas como la fibronectina y laminina, y fibras elásticas como la elastina.

Los fibroblastos tienen una gran importancia durante la cicatrización y reparación de las heridas al migrar hacia la zona lesionada y proliferar, aumentando la producción de matriz extracelular para reparar el defecto tisular. Se trata de células morfológicamente muy heterogéneas según su localización y actividad. Podemos distinguir varios tipos, o estados de diferenciación, que son regulados por señales específicas del microambiente que les rodea:

- Fibrocitos. Son fibroblastos relativamente quiescentes pero, en condiciones normales, son los responsables de la formación y mantenimiento de la matriz extracelular. Son células con poca capacidad para dividirse y sin actividad contráctil.

- Fibroblastos. Son células más activas con una mayor producción de matriz extracelular. Presentan un importante citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos de actina que les permite la movilidad celular.

- Miofibroblastos. Los miofibroblastos son una subpoblación de fibroblastos que presentan características intermedias entre los fibroblastos y las células del músculo liso. Por un lado, son células formadoras de matriz extracelular y por otro presentan características contráctiles y expresan la α -SMA (actina α del músculo liso) (14,15). Los miofibroblastos exhiben diferencias fenotípicas según los órganos en los que se encuentren. Con el microscopio óptico son indistinguibles de los fibroblastos, pero con microscopía electrónica se pueden ver los filamentos de actina bajo la membrana plasmática. En los tejidos normales, los miofibroblastos son poco activos, sin embargo, tras lesiones tisulares se activan, proliferan y aumentan la producción de colágeno y otros integrantes de la matriz extracelular y, a medida que avanza la cicatrización, se contraen contribuyendo a reducir el área dañada. En algunas enfermedades que cursan con fibrosis de los tejidos como la cirrosis hepática, el enfisema y la fibrosis pulmonar y renal existe una alteración de los miofibroblastos (16).



Fig. 1: Esquema de los mecanismos de restauración tisular.

ESTRATEGIAS DE LA MEDICINA REGENERATIVA

Basándonos en estos principios fisiológicos, la medicina regenerativa utiliza tres tipos de estrategias:

Inducción química o biológica

Representa el área de la medicina regenerativa que más impacto ha tenido hasta la actualidad (17). Muchos agentes tópicos han sido utilizados en medicina por su eficacia en acelerar la reparación tisular de las heridas (18). Moléculas como la angiotensina, ácido retinoico, aminoácidos como la L-arginina, factores solubles como citoquinas o interleuquinas (IL), derivados de purinas sintéticas, preparados sintéticos de matriz extracelular (Alloderm®, Integra®) y Factores de Crecimiento (FC) han sido utilizados para estimular la función y producción de células endógenas (19,20). De todos ellos, los FC son los más importantes.

Factores de crecimiento: Generalidades

El buen funcionamiento y la interrelación de las células diferenciadas dentro de los tejidos, precisa de la existencia de unas señales de comunicación intercelular que incluyen una gran variedad de proteínas como las citoquinas, IL, FC, hormonas y neurotransmisores. Los FC son un conjunto de sus-

tancias, mayoritariamente de naturaleza proteica, cuya función es regular una gran variedad de procesos celulares como la proliferación y el metabolismo celular, la quimiotaxis, migración y diferenciación dirigida, y la producción de matriz extracelular. Estos factores juegan un importante papel en la reparación tras agresiones tisulares, de ahí su importancia en medicina regenerativa así como en oncología experimental, siendo muy útil el estudio de estas moléculas reguladoras en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de algunas neoplasias (21).

Los FC están presentes en casi todos los tejidos y son producidos por la mayoría de las células, pero sobre todo por fibroblastos, células endoteliales y leucocitos (monocitos y macrófagos), almacenándose en la médula ósea y en las plaquetas. Se suelen sintetizar en forma de moléculas precursoras, o profactores, que posteriormente son procesados por enzimas proteolíticas para completar la síntesis de la molécula madura que interacciona con receptores específicos de la membrana celular. Su efecto es multifuncional dependiendo de la célula diana sobre la que actúen, de su estado fisiológico, de su relación con otras células y con la matriz extracelular, y

TABLA 1. Características más importantes de los principales factores de crecimiento que actúan a nivel de la superficie ocular

Factores de crecimiento			
FC	Is	c.p.	Acción
TGF-β	5	P, m, n, o	Quimiotaxis, prod. colágeno, angiogénesis, inhibe la prolif. de cel epiteliales y migración de queratocitos, induce diferenciación de fibroblastos, favorece apoptosis, induce la expresión de receptores para PDGF, disminuye la síntesis de MMP
PDGF	5	P, m, o, f	Angiogénesis, quimiotaxis, proliferación de cel. mesenquimales, facilita la formación de colágeno y prolif. y migración epitelial, induce diferenciación de fibroblastos
IGF	2	P, m, o	Estimula la síntesis de hueso, potente quimiotáctico de cel. endoteliales
EGF	1	P, f, cel endot.	Prolif. migración y diferenc. de cel epiteliales, fibroblastos. Efecto antiapoptótico
FGF	2	f, m, o, P	Prolif. y diferenciación de los fibroblastos y otras cel. mesénquima. Aumenta la prod. de fibronectina y favorece la angiogénesis
TGFα		P, f, m, n	Prolif. y migración de cel. epiteliales. Efecto angiogénico

FC: Factores de crecimiento; TGF-β: Factor de crecimiento transformante β; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF: factor de crecimiento tipo insulina; EGF: factor de crecimiento epitelial; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; TGF-α: factor de crecimiento transformante α; Is: isoformas; c.p.: células productoras; P: plaquetas; m: macrófagos; n: neutrófilos; o: osteoblastos; f: fibroblastos; cel. endot: células endoteliales.

de la presencia de otros FC. La mayoría de los factores actúan de forma local (paracrina, autocrina o yuxtacrina), pero también pueden actuar a distancia. Según su especificidad celular, podemos diferenciar entre factores selectivos como la IL-2 y la eritropoyetina, que actúan sobre células muy específicas, y otros poco selectivos como el Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) que actúan sobre una gran variedad de células. En la tabla 1 quedan recogidas las características más importantes de los principales FC que actúan a nivel de la superficie ocular.

Como se ha comentado anteriormente, los FC actúan a través de receptores de membrana específicos (fig. 2). Éstos son proteínas o glicoproteínas, localizadas en el espesor de la membrana plasmática, que presentan tres partes bien definidas: un extremo exterior (dominio externo) responsable de la unión al ligando, una parte transmembrana y otro extremo interior (dominio interno o intracelular). Cuando un FC se une al dominio externo desencadena en el dominio interno una reacción secuenciada de respuestas intracelulares, genéricamente conocida como «transducción de la señal», que van a producir un efecto o acción determinada. Según el dominio interno podemos distinguir varios tipos de receptores transmembrana. Algunos presentan actividad tirosina quinasa intrínseca como los receptores de factores como el EGF, Factor de Crecimiento Transformante α (TGF- α), Factor de Crecimiento de Hepatocitos

(HGF), PDGF, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y Factor de Crecimiento tipo Insulina (IGF-1). Tras la unión al ligando, estos receptores inician una fosforilación en cascada de moléculas efectoras, segundos mensajeros, que van a transducir la señal a través de sistemas como el MAP quinasa, implicado en la producción de nuevos FC, de receptores para dichos factores y de proteínas que controlan la entrada en el ciclo celular, o sistemas como el fosfoinositol 3 quinasa, implicado en la proliferación celular e inhibición de la apoptosis. Otros FC como el TGF- β presentan un receptor transmembrana con un dominio interno con actividad serina-treonina quinasa. Existen otras moléculas de transducción intracelular, o segundos mensajeros, como la proteína G, AMP cíclico, GMP cíclico, ión calcio o el óxido nítrico que intervienen en el proceso de respuesta celular a estímulos, incluyendo la regulación de la expresión genética, regulación de vías metabólicas o modificaciones del citoesqueleto. A pesar de la gran diversidad de receptores y estímulos, los sistemas de transducción son limitados y universales. La intensidad del efecto de los FC va a depender de su concentración (actúan a concentraciones muy bajas, del orden de picogramos), de la cantidad de receptores presentes en la membrana, de la existencia de otras moléculas que interfieran con la unión ligando-receptor, de la vida media del complejo receptor-ligando y de la disponibilidad intracelular de segundos mensajeros activados. Las propias células pueden modificar la sensibilidad del receptor y su número.

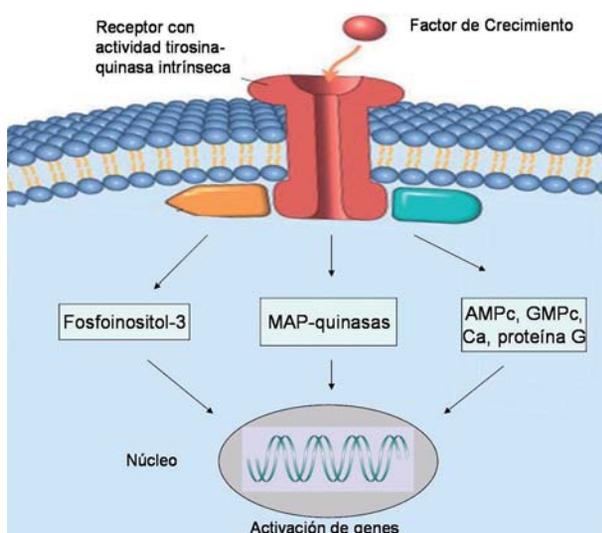


Fig. 2: Receptor de membrana con actividad tirosina quinasa intrínseca. La estimulación del receptor inicia la activación de genes en el núcleo a través de diferentes sistemas de transducción de la señal (2^{os} mensajeros).

Trasplantes celulares

La terapia con células madre se ha propuesto como solución a múltiples problemas clínicos que van desde la reparación estructural, o reemplazamiento de tejidos dañados, hasta la restauración fisiológica de los defectos funcionales o metabólicos de los mismos (22). Estas terapias celulares están basadas en la capacidad de respuesta de las células madre y su versatilidad para proliferar y diferenciarse en distintas líneas celulares según el microambiente que las rodea (23). Podemos definir una célula madre como aquella célula indiferenciada y no especializada que puede autorrenovarse de forma indefinida y diferenciarse a determinados fenotipos celulares (24).

Las primeras evidencias científicas relativas a la existencia de células madre en el organismo adulto

proviene de experimentos realizados por Till y McCulloch a finales de la década de los 50 (25), aunque, es a raíz de la identificación, caracterización y aislamiento de estas células cuando se produce un aumento exponencial del interés por su utilización en medicina. Además de su empleo en medicina regenerativa, las células madre pueden actuar como vehículos en terapias génicas y antitumorales.

Según su capacidad de diferenciación, las podemos clasificar en:

- **Células totipotenciales.** Capaces de diferenciarse en cualquier tejido ya sea embrionario o extraembrionario (placenta y anejos). Se obtienen de embriones en la fase de blastocisto.

- **Células pluripotenciales.** Capaces de diferenciarse a células de cualquier tejido adulto. Se aíslan del embrión preimplantacional.

- **Células multipotenciales.** Capaces de diferenciarse a cualquier tejido adulto, pero dentro de una misma capa embrionaria (endodermo, mesodermo y ectodermo). Se aíslan en tejidos adultos, cordón umbilical, líquido amniótico y placenta (fig. 3).

Según su origen, las podemos clasificar en:

- **Células madre embrionarias.** Son células pluripotenciales, con una gran capacidad regenerativa y un cariotipo normal. No expresan niveles de antígenos HLA clase II y muy bajos niveles de antígenos HLA clase I. Son células con una importante capacidad cancerígena y su utilización en clínica plantea muchos problemas éticos (26,27).

- **Células madre gonadales.** Son pluripotenciales, con gran capacidad regenerativa y fáciles de expandir aunque difíciles de extraer ya que se obtie-

nen de la cresta gonadal en fetos de entre 5-10 semanas. Al igual que las anteriores, su utilización plantea numerosos problemas éticos y tienen importante capacidad cancerígena.

- **Células madre adultas.** Son multipotenciales y tienen menor capacidad de regeneración que las anteriores aunque son más fáciles de obtener y de expandir, tienen poca capacidad cancerígena, pueden utilizarse de forma autóloga y su utilización no plantea problemas éticos. Son las células madre más utilizadas en medicina regenerativa y se encuentran en múltiples tejidos como la médula ósea, músculo esquelético, epidermis, intestino, testículo, hígado, sistema nervioso central, corazón y tejido adiposo. Dentro de las células madre adultas tenemos que destacar, por su importancia, a las células madre mesenquimales. Estas células se encuentran en la médula ósea, en el tejido adiposo, en la sangre y el cordón umbilical. Presentan unas características similares a las células embrionarias en cuanto a capacidad inmunosupresora, inmunomoduladora y regenerativa, pero sin el potencial oncogénico de éstas. Las células mesenquimales no expresan antígenos HLA clase II (HLA DR) y está muy disminuida la expresión de antígenos HLA clase I. Por otro lado, actúan suprimiendo la producción de linfocitos y por tanto reduciendo la incidencia y severidad de cuadros de rechazo (28,29).

- **Células madre del líquido amniótico, placenta y cordón umbilical.** Son pluripotentes, expresando marcadores y características comunes a células embrionarias y adultas. Presentan una buena capacidad regenerativa y son fáciles de obtener y expandir, aunque su utilización plantea problemas éticos (30,31).

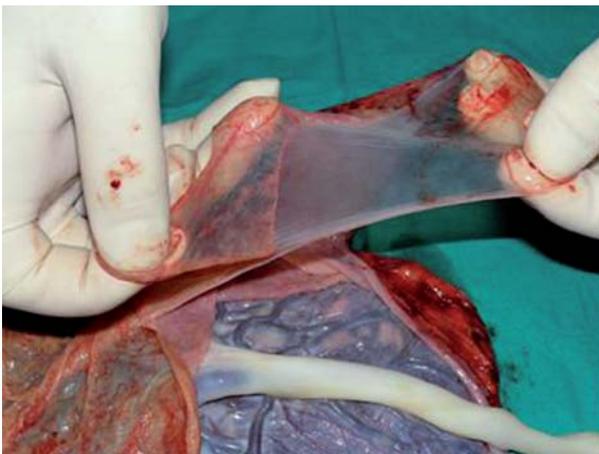


Fig. 3: Placenta, cordón umbilical y membrana amniótica. Estos tejidos se obtienen tras un parto por cesárea programada.

Trasplante de tejidos y órganos artificiales

La obtención de tejidos y órganos artificiales supone, actualmente, el mayor reto para la medicina regenerativa por la falta de órganos para trasplantes, motivo que ha impulsado el desarrollo de esta forma de terapia que ofrece prometedoras expectativas.

La utilización de células madre, sobre todo las mesenquimales, junto con el mejor conocimiento de sus interacciones con la matriz extracelular y los factores biológicos presentes en el microambiente, así como la mejora en los sistemas de anclaje con la utilización de biomateriales sintéticos de tercera generación (hidrogeles) ha permitido el desarrollo de tejidos artificiales (32,33). Éstos pueden ser autó-

logos, generados a partir de células del propio paciente, o alogénicos, sintetizados a partir de células de donante. Los tejidos autólogos representan la mejor opción para reparaciones tisulares permanentes (34), pero se precisan al menos dos semanas para disponer de estos tejidos, por lo que en casos de defectos estructurales pasajeros o agudos se pueden utilizar tejidos alogénicos ya preparados y listos para su uso. Estos tejidos alogénicos acabarán siendo inmunológicamente rechazados por el receptor, pero nos permiten una adecuada aproximación terapéutica durante la fase aguda de procesos como quemaduras, estimulando la regeneración del tejido propio y dando tiempo para utilizar tejidos autólogos si fuera preciso (33,35). A pesar de que la FDA ha aprobado la utilización de estos tejidos sintetizados a partir de células procedentes de donante (33), el empleo de tejidos alogénicos sigue generando importantes debates (36). El Epicel[®] fue el primer tejido sintético elaborado a partir de células epidérmicas autólogas (37).

La creación de tejidos artificiales precisa no sólo aprovechar el potencial regenerativo de las células madre, sino también la utilización de biomateriales sintéticos que, además de aportar un andamiaje o esqueleto, actúen de forma interactiva mediante señales biológicas con las propias células, como ocurre fisiológicamente en la matriz extracelular (38,39). Podemos diferenciar tres generaciones de biomateriales: los de la primera generación (años 60-70) trataban de imitar las propiedades físicas del tejido sin aportar toxicidad; los de la segunda generación (años 80-90) son ya bioactivos y biodegradables (poliglicol), mientras que los de la tercera generación (hidrogeles) tienen las propiedades químicas y físicas de la matriz extracelular incorporando señales biológicas y FC que permiten una mayor adhesión y diferenciación celular (23,40). Gracias a la utilización de estos biomateriales así como al potencial regenerativo de las células mesenquimales, se ha logrado sintetizar segmentos de intestino, tráquea y hueso, así como una vejiga artificial y una mandíbula (41,42).

MEDICINA REGENERATIVA A NIVEL CORNEAL: CARACTERÍSTICAS DE LA CÓRNEA

Los mecanismos de regeneración tisular son muy similares en la mayoría de los tejidos. La córnea, sin embargo, presenta unas características específicas en cuanto a morfología, tensión, permeabilidad y trans-

parencia óptica que la diferencian del resto de tejidos del organismo. Se trata de un tejido altamente diferenciado para permitir la transmisión y refracción de la luz, siendo el principal elemento óptico del ojo.

Histológicamente, la córnea está formada por un epitelio escamoso no queratinizado, una zona acelular de unas 10 µm bajo la membrana basal del epitelio que se conoce como capa de Bowman, un estroma de tejido conectivo, una membrana basal de unos 10 µm producida por el endotelio que se denomina membrana de Descemet y una monocapa de células hexagonales, sin capacidad de división, denominada endotelio y cuya principal misión es actuar de barrera evitando el paso de agua al estroma corneal y extraer agua de forma activa del estroma hacia el humor acuoso.

El epitelio corneal está compuesto de unas 5-7 capas de células cuya morfología varía según estén localizadas a nivel basal, intermedio o superficial. Las células epiteliales están unidas entre sí y a la membrana basal a través de complejas estructuras (desmosomas, hemidesmosomas, uniones estrechas «tight junctions» y uniones comunicantes «gap junctions») y de un entramado intercelular, compuesto por proteínas de adhesión, como la cadherina e integrinas, y por microfilamentos, que confiere al epitelio gran estabilidad y le permite realizar sus funciones de barrera, refractivas y metabólicas. Todo este complejo entramado celular está en continua renovación y cada 7-10 días el epitelio corneal es reemplazado por completo. Las células madre responsables de la renovación del epitelio corneal se localizan en las empalizadas de Vogt (fig. 4). En condiciones normales, el epitelio tiene una gran capacidad para regenerarse tras agresiones. Al daño epitelial sigue una primera fase latente, de unas 4-6 horas de duración, en la que se eliminan restos celulares y se reducen los hemidesmosomas localizados alrededor de la lesión para facilitar la migración de las células vecinas en lo que se denomina fase de migración celular que dura entre 24-48 horas y en la que se recupera el efecto barrera al quedar cubierta la lesión. En una tercera fase, denominada de proliferación celular, se activan las células madre del limbo y se restablecen las terminaciones nerviosas, las uniones intercelulares y los complejos de unión con la membrana basal (43,44).

El estroma corneal constituye el 90% del espesor corneal y en un 80% está compuesto por agua. Las fibras de colágeno suponen el 80% del peso en seco de la córnea. El colágeno tipo I es el predominante

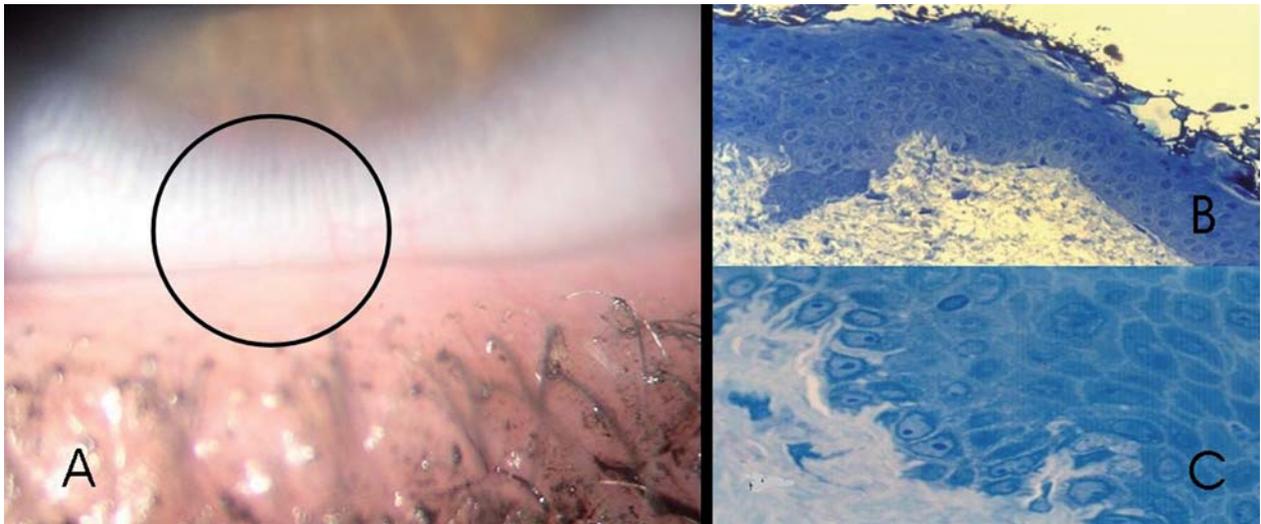


Fig. 4: Empalizadas de Vogt. Imagen macroscópica con lámpara de hendidura (A) y con microscopía óptica (B y C).

y en menor proporción el colágeno tipo VI, V y III. Estas fibras se distribuyen en unas 250-300 capas o láminas paralelas a la superficie, y en toda la longitud de la córnea, teniendo todas las fibras una dirección similar dentro de cada capa y estando las láminas orientadas de forma oblicua entre ellas (43,44). Por otro lado, el diámetro de las fibras de colágeno en el estroma corneal es el más pequeño del organismo, entre 25-30 nm, lo que permite el paso de un 90% del espectro visible de la luz (400-700 nm). La capacidad de transmisión de la luz en la córnea se encuentra entre 310 nm (radiación ultravioleta) los 780 nm (radiación infrarroja). La mayor absorción de luz en la córnea se sitúa en el epitelio, y sobre todo para longitudes de onda corta (45). Esta disposición de las fibras de colágeno, así como el diámetro de las mismas, determina la transparencia óptica de la córnea y también permite el soporte tectónico necesario para mantener la curvatura corneal, tan importante para su función refractiva. El mantenimiento de esta disposición de las fibras de colágeno tras las agresiones del estroma corneal es fundamental para mantener las propiedades y funciones de la cornea, pero, dada la complejidad y estricta organización de esta estructura, es muy difícil que ésta se pueda regenerar tras las agresiones por lo que, en la actualidad, la regeneración del estroma corneal continúa siendo un importante reto y en la mayoría de los casos de daño sobre el estroma nos tendremos que conformar con la reparación del tejido.

Los elementos celulares constituyen sólo un 5% del peso en seco del estroma, pero son los respon-

sables del mantenimiento y renovación del estroma corneal. Como en cualquier otro tejido conectivo, a nivel corneal podemos encontrar fibroblastos en diferentes estadios de diferenciación y activación: queratocitos (fibrocitos), fibroblastos y miofibroblastos. Los queratocitos son unas células altamente especializadas que se encuentran en el estroma corneal. Son células sin actividad contráctil, quiescentes y con elevada expresión de proteoglicanos como el queratán sulfato. Los fibroblastos son células con actividad contráctil y más activas, en cuanto a proliferación y producción de matriz extracelular, que los queratocitos. Los miofibroblastos tienen una marcada actividad contráctil y una mayor expresión de proteoglicanos como el dermatán sulfato. Las diferencias en su fenotipo definen el rol de cada una de estas células en el mantenimiento de la transparencia corneal y en la respuesta de la córnea ante las agresiones. Así los queratocitos son los responsables del mantenimiento y remodelación fisiológica de la matriz extracelular del estroma y de la transparencia corneal. Los fibroblastos repueblan y remodelan los tejidos tras agresiones y los miofibroblastos producen la contracción de las heridas. Fibroblastos y miofibroblastos tienen en común una gran capacidad para producir matriz extracelular, muy útil en los procesos de agresión tisular, pero con diferencias estructurales en cuanto a la producción de colágeno y proteoglicanos que favorecen la fibrosis y, por tanto, la pérdida de transparencia del estroma corneal (46,47). Como en otros tejidos, la diferenciación de estas células es controlada por señales específicas del microambiente (48,49),

jugando también el epitelio un importante papel en el inicio de los procesos de regeneración estromal en un proceso mediado por FC como el TGF- β y sobre todo el PDGF. Así el IGF-1 y la IL-1 α favorecen la proliferación de queratocitos, pero sin alterar su fenotipo (50). El TGF- β induce diferenciación a miofibroblastos (51). El FGF-2 y el PDGF favorecen la diferenciación y proliferación de fibroblastos, así como la migración de los queratocitos, sin embargo, el FGF-2 aumenta la expresión de queratán sulfato y disminuye la expresión de α -SMA, mientras que el PDGF participaría en un mecanismo sinérgico con el TGF- β en la diferenciación a fenotipo miofibroblasto (52,53). Esta diferente respuesta de fibroblastos al PDGF y al FGF-2, ha llevado a plantear a algunos autores como Jester et al., la posibilidad de que existan dos tipos de fenotipo fibroblasto: los fibroblastos tipo I que en presencia de FGF-2 aumentan la expresión de queratán sulfato y participarían en respuestas no fibróticas sin alteración de la transparencia, y los fibroblastos tipo II o protomiofibroblastos que en presencia de PDGF expresan más dermatán sulfato y una mayor tendencia a diferenciarse a miofibroblastos, participando en respuestas cicatriciales fibróticas con alteración de la transparencia corneal (48). La reversibilidad del proceso de diferenciación o, lo que es lo mismo, el retorno de fibroblastos y miofibroblastos a queratocitos no está tan clara y ésta suele ser incompleta. La adición de factores como el IGF-1 y la IL-1 α favorecen esta desdiferenciación, aunque se piensa que los miofibroblastos y los fibroblastos tipo II inician un proceso de apoptosis una vez finalizada la cicatrización (48).

ESTRATEGIAS DE LA MEDICINA REGENERATIVA EN LA CórNEA

A nivel corneal, y a pesar de sus características específicas, podemos actuar mediante las tres estrategias de la medicina regenerativa. Como en otros tejidos, la inducción química o biológica de la regeneración mediante FC u otras sustancias ha sido la que más desarrollo ha tenido y a la que dedicaremos varios capítulos de esta monografía al hablar del suero autólogo, de los derivados plaquetarios y los adhesivos tisulares biológicos. En este capítulo vamos a repasar, de forma breve, las otras dos estrategias de la medicina regenerativa, como son la terapia con células madre y el trasplante de tejidos y órganos artificiales.

Terapia con células madre

En pacientes con insuficiencia limbar se produce una incapacidad de las células madre del limbo para mantener la integridad del epitelio corneal. Este cuadro se produce por diversas entidades nosológicas que, actuando por diferentes mecanismos patogénicos, van a producir una disfunción cuantitativa o cualitativa de estas células o del microambiente que las rodea. Las diferentes etiologías capaces de producir insuficiencia limbar se pueden dividir en dos grupos según que el daño se produzca por una afectación extrínseca, como ocurre en casos de enfermedades inflamatorias (penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, Lyell, acné rosácea), quemaduras, infecciones, lentes de contacto, cirugía limbar repetida y por fármacos como la mitomicina o 5-fluoracilo, o por afectación intrínseca como ocurre en enfermedades como la aniridia congénita, la eritroqueratodermia congénita, síndromes de neoplasia endocrina múltiple o la insuficiencia limbar idiopática. Estas células madre del limbo son la única fuente de células epiteliales con fenotipo corneal (expresan citoqueratinas como la CK12 y CK3), por lo que el daño sobre ellas va a conllevar el crecimiento de células epiteliales de estirpe conjuntival (CK19) sobre la córnea, lo que constituye el hallazgo más característico de la insuficiencia limbar. Este proceso de conjuntivalización se asocia a destrucción de la membrana basal con aparición de neovascularización superficial, fibrosis subepitelial, inflamación crónica, hiperemia conjuntival, inestabilidad e irregularidad de la superficie ocular que clínicamente se va a traducir en defectos epiteliales persistentes o recurrentes y disminución progresiva de la transparencia corneal que conduce a la pérdida de visión (54-56) (fig. 5).

El tratamiento de la insuficiencia limbar debe estar encaminado a repoblar el limbo esclerocorneal de células madre limbares y/o a restaurar el microambiente que las rodea. Los derivados hemáticos como el suero autólogo o los concentrados plaquetarios, así como el trasplante de membrana amniótica, van a estimular sobre todo el microambiente limbar aportando sustancias activas que favorecen el desarrollo y expansión de las células madre residuales tras la agresión, mejorando los mecanismos implicados en la renovación y mantenimiento de los epitelios de la superficie ocular. Sin embargo, en pacientes con insuficiencia limbar grave necesitamos aportar células madre limbares para restaurar una superficie epitelial con fenotipo corneal (57). Estas

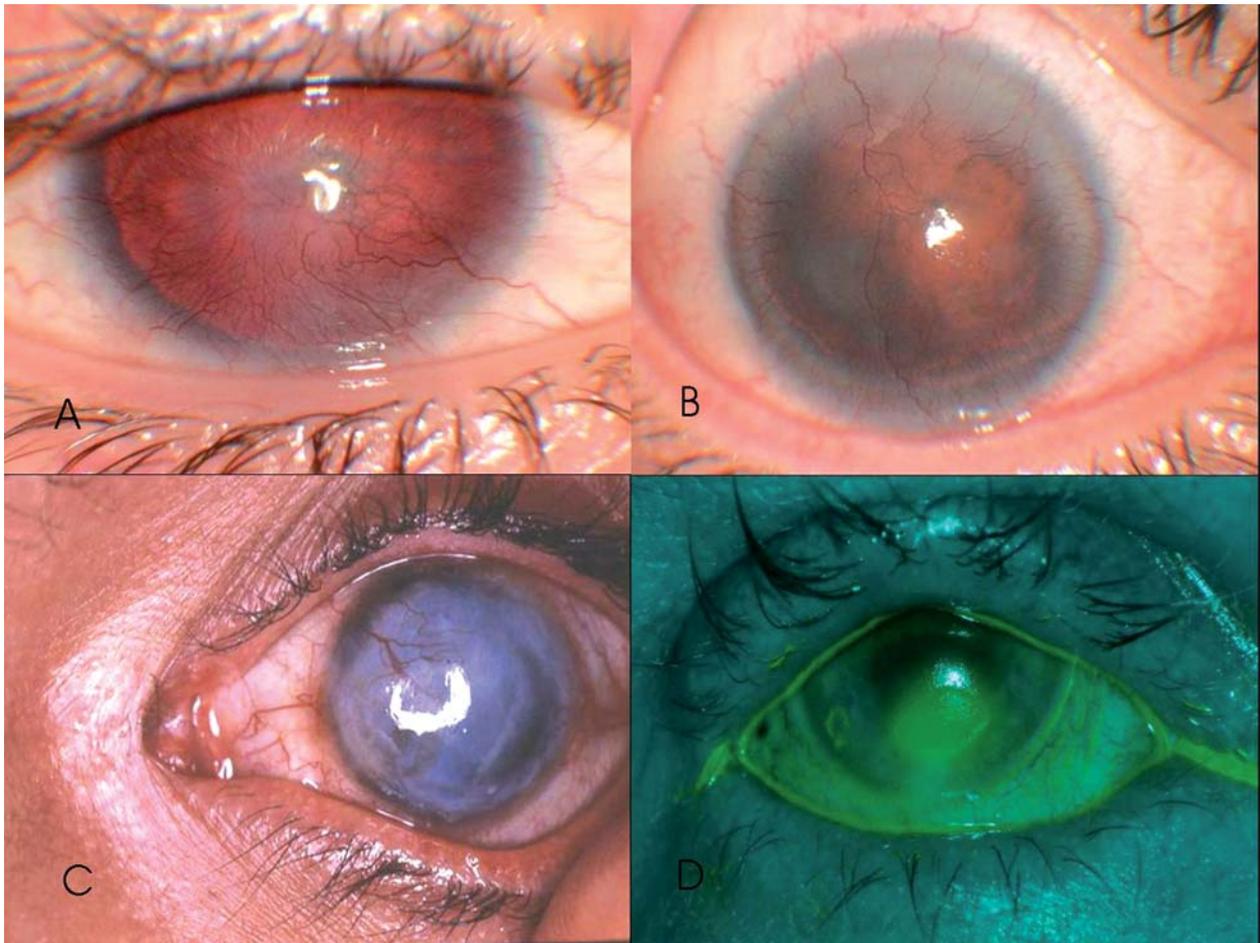


Fig. 5: Manifestaciones clínicas del síndrome de insuficiencia limbar. Neovascularización corneal (A) y neovascularización y fibrosis subepitelial en pacientes con aniridia (B). Neovascularización y opacidad corneal (C). Defecto epitelial persistente en paciente con penfigoide ocular cicatricial (D).

células se pueden aportar mediante la realización de un trasplante de limbo o mediante el trasplante de células madre.

El trasplante de limbo lo podemos realizar con tejido limbar procedente de donante vivo, ya sea autólogo o heterólogo, o con tejido limbar procedente de donante cadáver, aprovechando el anillo limbar que se desecha tras la queratoplastia (58) (figs. 6 y 7). La realización conjunta de trasplante de limbo y trasplante de membrana amniótica incrementa el beneficio obtenido con cada una de las técnicas por separado (59).

Recientemente han sido publicados nuevos métodos de reconstrucción de la superficie ocular en pacientes con insuficiencia limbar bilateral utilizando cultivos de células madre adultas obtenidas del limbo o la mucosa oral (60-62). La principal ventaja de esta técnica de cultivo de células madre es que a

partir de una pequeña cantidad de tejido limbar, o de mucosa oral, podemos obtener tejido suficiente para

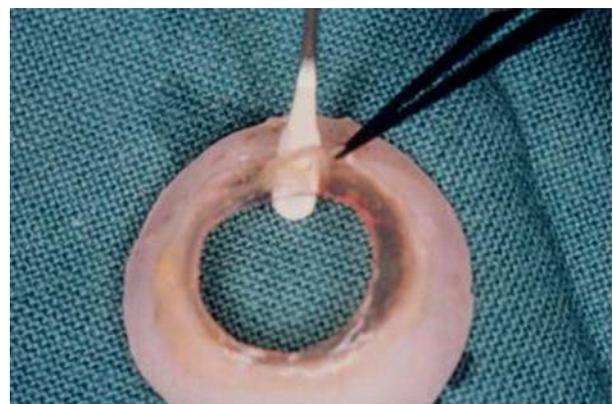


Fig. 6: Preparación del anillo limbar de donante cadáver tras haber obtenido el botón corneal para queratoplastia.

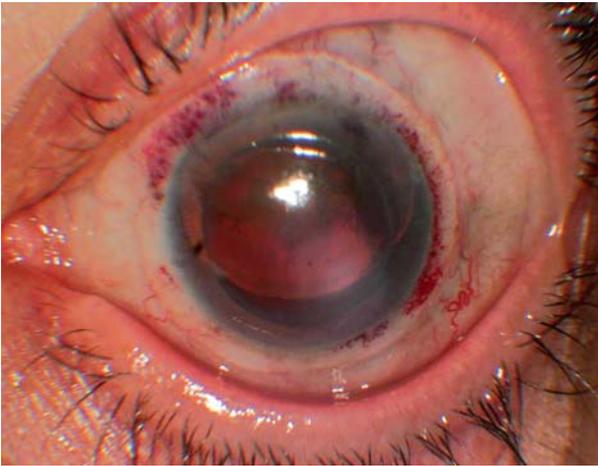


Fig. 7: Trasplante de limbo realizado con tejido limbar (360°) procedente de donante cadáver.

implantarlo nuevamente en la superficie ocular después de su expansión sobre membrana amniótica u otros sustratos. Estas técnicas permiten la reconstrucción de la superficie ocular con epitelio autólogo, evitando el riesgo de rechazo y la necesidad de medicación inmunosupresora necesaria en casos de trasplantes de limbo heterólogos (63,64).

Las células madre, independientemente de su localización, presentan una serie de características comunes como larga vida, un potencial ilimitado para dividirse, un ciclo celular lento, poca o nula diferenciación y estar ubicadas en lugares protegidos (65). Estas células son influenciadas por factores séricos que participan en la regulación de los procesos celulares. Al contrario de lo que sucede con otras células madre como las hemapoyéticas, en las que existen marcadores específicos para su identificación, las células madre del limbo sólo son demostra-

bles por evidencias indirectas, habiéndose propuesto numerosas moléculas como marcadores si bien su importancia real en la identificación de estas células sigue siendo controvertida (66,67). Cuando una célula madre se divide, una de ellas mantiene su condición de célula madre y la otra, después de algunas mitosis, inicia la diferenciación (68). Esta forma de división asimétrica permite la renovación celular así como la autoperpetuación de la célula madre (69).

Las células madre del limbo son células multipotenciales pero muy comprometidas hacia células epiteliales de fenotipo corneal. Estas células se dividen por mitosis en otras células con gran capacidad mitótica denominadas células amplificadoras transientes o transitorias las cuales, después de varias divisiones, inician un proceso de diferenciación hacia las células alares y superficiales del epitelio corneal, migrando de forma centrípeta y hacia la superficie en lo que se ha denominado hipótesis XYZ (70) (fig. 8).

La expansión ex-vivo de las células madre puede realizarse sobre láminas de fibrina, sobre la superficie cóncava de una lente de colágeno o sobre membrana amniótica. La membrana amniótica es un sustrato biológico ideal para la expansión ex-vivo ya que proporciona una gruesa membrana basal, que facilita la migración y adhesión de las células epiteliales, y un estroma avascular con abundantes FC (fig. 9). Existen varias técnicas de cultivo según el tipo de membrana amniótica utilizada (intacta o desnuda al quitarle el epitelio), según se utilicen o no capas nutrientes fibroblásticas 3T3, o que el explante limbar sea completo o sólo se cultiven las células epiteliales. Los trasplantes de células madre se pueden hacer con células limbares del propio paciente (autotrasplante) o con células procedentes de donante (alotrasplante). También se pueden reali-

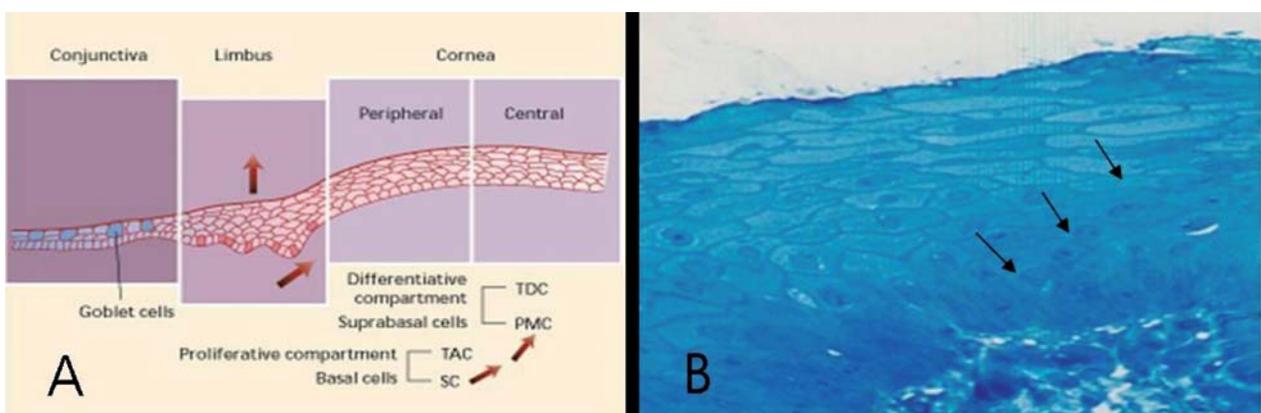


Fig. 8: Esquema de la renovación del epitelio corneal (A). Biopsia limbar que muestra la migración y diferenciación de las células epiteliales de la cornea.



Fig. 9: Fragmento de membrana amniótica. Las características de este tejido le permiten ser un sustrato biológico ideal para la expansión de células en cultivos.

zar con células procedentes de mucosa oral y con células madre mesenquimales.

Córneas artificiales

Las peculiares características de la córnea determinan que cuando se produce un daño sobre el estroma corneal la reparación del tejido va a conllevar, generalmente, una alteración de la transparencia óptica con disminución de visión que, en muchos casos, va a precisar la realización de queratoplastias lamelares o penetrantes. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades corneales son una de las principales causas de ceguera, afectando a más de 10 millones de personas en el mundo y diagnosticándose cada año entre 1,5 y 2 millones de pacientes nuevos con problemas de transparencia óptica secundaria a traumatismos o úlceras corneales (71).

Como ocurre con otros órganos, la demanda de córneas para trasplantes es mucho mayor que la disponibilidad de las mismas. Este balance está empeorando por el incremento de la esperanza de vida de los potenciales donantes, que aumenta la frecuencia de enfermedades degenerativas incompatibles con la donación y que convierten a estos potenciales donantes en potenciales receptores, y sobre todo por el incremento de la cirugía refractiva. En EEUU se hacen al año unos 45.000 trasplantes de córnea, por lo que la necesidad de encontrar sustitutos corneales artificiales que puedan ser utilizados para reemplazar, total o parcialmente, estas córneas puede aportar importantes beneficios en el futuro.

La primera aproximación a lo que podríamos considerar una córnea artificial es la queratoprótesis. Los

modelos más antiguos requieren para su implantación cirugías complejas con alta incidencia de complicaciones y presentan un bajo índice de permeabilidad y de biointegración que, en muchos pacientes, condicionan el fracaso de las mismas. Estas prótesis han de tener transparencia, un apropiado índice refractivo, una tensión adecuada para realizar sus funciones de barrera, una buena permeabilidad a nutrientes y la capacidad de ser repoblada por células del receptor que faciliten la integración de la prótesis y disminuyan los procesos inflamatorios (72). Materiales como el polimetilmetacrilato (PMMA) aportan transparencia, mientras otros más hidrofílicos y flexibles como el poli-2 hidrometilmetacrilato (pHEMA) presentan una mayor transparencia y una mejor permeabilidad, pero se calcifican precozmente y presentan poca o nula capacidad de integración (73,74). La permeabilidad al oxígeno y a otros nutrientes es fundamental para la supervivencia de las células que rodean el implante. Algunos materiales como el perfluoropoliéter y derivados como el PDMS presentan una permeabilidad a glucosa similar a la de la córnea (75).

Una línea de investigación actual en medicina regenerativa es mejorar la biointegración de estas prótesis facilitando su colonización por células epiteliales y neuronas. Esto se puede conseguir utilizando polímeros que generen una respuesta biológica e interactiva con las células, como el perfluoropoliéter, o aumentando la capacidad de adhesión de estos polímeros sintéticos con sustancias bioactivas (76-78). El revestimiento de las prótesis con proteínas de la matriz extracelular como colágeno, laminina o fibronectina mejoran *in vitro* la proliferación y adhesión de las células, aunque estos resultados no han sido tan satisfactorios *in vivo* (78). La utilización de FC como el EGF mejora la proliferación y migración de las células epiteliales sobre las prótesis (79), mientras que el TGF- β parece prevenir la formación de membranas en la parte interna de la prótesis (80).

Por otro lado, la ingeniería tisular ha tratado de conseguir equivalentes corneales artificiales que pretendan reproducir la estructura de la córnea normal. Estas córneas artificiales pueden ser biológicas, utilizando para su fabricación colágeno, matriz extracelular y células del limbo esclerocorneal (81,82), o, sobre todo, semisintéticas utilizando colágeno y materiales sintéticos. Las córneas artificiales sintéticas están basadas en la idea de utilizar estructuras de soporte que mejoren las condiciones del microambiente e interactúen con las células. Con todo, imitar

la córnea es muy complejo y en muy pocos polímeros sintéticos las células crecen en tres dimensiones, por lo que los biopolímeros que podemos utilizar son muy limitados. El hidrogel de colágeno tipo 1 es el biopolímero predominante en la córnea y, por tanto, el más atractivo para ser utilizado como soporte para estas matrices, sin embargo, la biodegradación del colágeno y la poca resistencia de estos hidrogeles a bajas concentraciones hacen que sea preciso reforzarlos con técnicas de Cross-linking (83). El TERP5 es un polímero sintético que, como el hidrogel de colágeno, permite el crecimiento tridimensional de las células y con el cual se puede mezclar formando un copolímero que permite ser moldeado con la curvatura y dimensiones de la córnea (84). Este hidrogel presenta una muy buena transparencia óptica y permeabilidad al oxígeno y a la glucosa, poca reacción inmune e inflamatoria y posibilita el crecimiento epitelial, endotelial y la regeneración neuronal del injerto. Sus propiedades mecánicas pueden ser mejoradas mediante la acción del Cross-linking con el fin de conseguir una mayor dureza que nos permita suturarlas (85-87). En un trabajo reciente, Fagerholm et al. utilizan implantes biosintéticos en queratoplastias de pacientes con queratocono, encontrando una buena integración del implante con restauración de la película lagrimal, crecimiento de células estromales y epiteliales sobre el implante y regeneración neuronal con recuperación parcial de la sensibilidad corneal (88). En este trabajo, encontraron que tras 24 meses de seguimiento, el implante permaneció estable y avascular sin la necesidad de inmunosupresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Freed CR, Greene PE, Breeze RE. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001; 344: 710-9.
2. Tse HF, Kwong YL, Chan JK. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003; 361: 47-9.
3. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 8932-7.
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343: 230-8.
5. Perry D. Patients' voices: The powerful sound in the stem cell debate. *Science.* 2000; 287: 1423.
6. Smyth S, Heron A. Diabetes and Obesity: the twin epidemics. *Nat Med.* 2006; 12: 75-80.
7. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997; 276: 60-6.
8. Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science.* 2005; 310: 1919-23.
9. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patients-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007; 7: 39-49.
10. Okita K, Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. *Exp Cell Res.* 2010; 316: 2565-70.
11. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009; 460: 1132-5.
12. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010; 463: 1035-41.
13. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblast by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
14. Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, et al. Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol.* 1997; 50: 123-7.
15. Kropp BP, Zhang Y, Tomasek JJ, et al. Characterization of cultured bladder smooth muscle cells: assessment of in vitro contractility. *J Urol.* 1999; 162: 1779-84.
16. Docherty NG, Morales AI, López Novoa JM, et al. La transición de células epiteliales a miofibroblastos. Mecanismos involucrados y su posible relación con la fibrosis renal. *Nefrología.* 2007; 27: 681-8.
17. Ioannidou E. Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine. *Curr Pharm Des.* 2006; 12: 2397-408.
18. Fu X, Li X, Chen B, et al. Engineered growth factors and cutaneous wound healing: success and possible questions in the past 10 years. *Wound Repair Regen.* 2005; 13: 122-30.
19. Heitland A, Piatkowski A, Noah EM, et al. Update on the use of collagen/glycosaminoglycate skin substitute, six years of experience with artificial skin in 15 German burn centers. *Burns.* 2004; 30: 471-5.
20. Jiménez PA, Jiménez SE. Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am J Surg.* 2004; 187: 56S-64S.
21. Shields R. Growth factors for tumours. *Nature.* 1978; 272: 670-1.
22. Caplan AI, Reuben D, Haynesworth SE. Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 33: 3-14.
23. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005; 23: 47-55.
24. Ho AD. Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2005; 33: 1-8.
25. Till JE, McCulloch EA. Hemopoietic stem cells differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 605: 431-59.
26. Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol.* 2004; 275: 269-86.
27. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 1257-72.

28. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 568-84.
29. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5: 362-9.
30. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, et al. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod.* 2006; 74: 545-51.
31. Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristic of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005; 23: 1549-59.
32. Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65: 1-8.
33. Lysaght MJ, Hazlehurst AL. Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng.* 2004; 10: 309-20.
34. Peterson L, Minas T, Brittberg M. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 374: 212-34.
35. Horch RE, Kopp J, Kneser U, et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 592-608.
36. Civin CI, Rao MS. How many human embryonic stem cell lines are sufficient? A U.S perspective. *Stem Cells.* 2006; 24: 800-3.
37. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 1984; 311: 448-51.
38. Voytik-Harbin SL. Three-dimensional extracellular matrix substrates for cell culture. *Methods Cell Biol.* 2001; 63: 561-81.
39. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428: 487-92.
40. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295: 1014-17.
41. Dennis JE, Solchaga LA, Caplan AI. Mesenchymal stem cells for musculoskeletal tissue engineering. *Landes Biosci.* 2001; 1: 112-5.
42. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004; 364: 766-70.
43. Arffa RC. Anatomía. En Robert C. Arffa. *Grayson; enfermedades de la córnea (4.ª edición).* Madrid. Harcourt Brace España, SA. 1999; 1-22.
44. Duran de la Colina JA. Anatomofisiología de la córnea. En Juan A. Durán de la Colina. *Complicaciones de las lentes de contacto. LXXIV Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología.* Madrid. Tecnicmedia editorial SL. 1998; 13-27.
45. McMenamin PG, Steele C, McGhee CN. Cornea anatomy, physiology and healing. En *Excimer laser in Ophthalmology.* Editor Charles McGhee. Londres. Martin Dunita. 1997; 41-63.
46. Bourne WM. Cellular changes in trasplanted human corneas. *Cornea.* 2001; 20: 560-9.
47. Ohno K, Mitooka K, Nelson LRet al. Keratocyte activation and apoptosis in transplanted human corneas in a xenograft model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 1025-31.
48. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res.* 2003; 77: 581-92.
49. Andresen JL, Ledet T, Ehlers N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-1, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res* 1997; 16: 605-13.
50. Beales MP, Funderburgh JL, Jester JV, et al. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1658-63.
51. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, et al. Proteoglycan expression during transforming growth factor β -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 44173-8.
52. Maltseva O, Folger P, Zekaria D, et al. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2490-5.
53. Jester JV, Huang J, Petroll WM, et al. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002; 75: 645-57.
54. Rivas L, Murube J, López García JS, et al. Características morfológicas de la unión limboconjuntival en personas sanas y con deficiencia limbal. *Boletín de la Soc. Oftalmol. de Madrid* 2003(43): 9-14.
55. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I. Síndrome de insuficiencia limbal. *Revista Thea de Superficie Ocular* nº 24. 2007.
56. López García JS, Rivas L, García Lozano I. Determinación del grado de metaplasia escamosa del epitelio corneal como factor diagnóstico de insuficiencia limbal. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2006; 81: 281-8.
57. Gatinel D, Nghiem MH, Chaine G. Early limbal autograft alter alkali burn of the ocular surface. *J Fr Ophthalmol.* 1999; 22: 76-8.
58. James SE, Rowe A, Llari L, et al. The potencial for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea* 2001; 20: 488-94.
59. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cells deficiency. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 431-41.
60. Kawashima M, Kawakita T, Satake Y, Higa K, Shimazaki J. Phenotypic study after cultivated limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 1337-44.
61. Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T. Transplantable cultivated mucosal epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res.* 2004; 78: 483-91.
62. Inatoni T, Nakamura T, Koizumi N, et al. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea.* 2005; 24(8Suppl.): S32-S38.
63. Satake Y, Dogru M, Yamane GY, et al. Barrier function and cytologic features of the ocular surface epithelium after autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Arch Ophthalmol.* 2008; 126: 23-8.

64. Inatoni T, Nakamura T, Kojyo M, et al. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2006; 142: 757-64.
65. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000; 44: 415-25.
66. Wolosin JM, Schütte M, Zieske JD, et al. Changes in connexin 43 in early ocular surface development. *Curr Eye Res.* 2002; 24: 430-8.
67. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res.* 2005; 81: 247-64.
68. Beebe D, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 1815-25.
69. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye.* 1994; 8: 170-83.
70. Thoft RA, Friend J. The XYZ hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24: 1442-3.
71. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: 214-21.
72. Griffith M, Hakim M, Shimmura S, et al. Artificial human corneas. Scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea.* 2002; 21: S1-S8.
73. Vijayasekaran S, Chirila TV, Robertson TA, et al. Calcification of poly(2-hydroxymethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea: a 3-month study. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2000; 11: 599-615.
74. Hicks CR, Crawford GJ, Dart JK, et al. AlphaCor clinical outcomes. *Cornea.* 2006; 25: 1034-42.
75. Liu L, Sheardown H. Glucose permeable poly(dimethyl siloxane) poly(N-isopropyl acrylamide) interpenetrating networks as ophthalmic biomaterials. *Biomaterials.* 2005; 26: 233-44.
76. George A, Pitt WG. Comparison of corneal epithelial cellular growth on synthetic cornea materials. *Biomaterials.* 2002; 23: 1369-1373.
77. Aucoin L, Griffith CM, Pleizier G, et al. Interactions of corneal epithelial cells and surfaces modified with cell adhesion peptide combinations. *J Biomater. Sci Polym Ed.* 2002; 13: 447-62.
78. Sweeney DF, Xie RZ, Evans MD, et al. A comparison of biological coatings for the promotion of corneal epithelialization of synthetic surface in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 3301-9.
79. Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, et al. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. *Biomaterials.* 2005; 26: 7286-96.
80. Merrett K, Griffith CM, Deslandes Y, et al. Interactions of corneal cells with transforming growth factor β_2 -modified poly dimethyl siloxane surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2003; 67: 981-93.
81. Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, et al. Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2007; 13: 524-33.
82. 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.
83. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 3-12.
84. Li F, Carlsson D, Lohmann C, et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 15346-51.
85. Duan X, Sheardown H. Crosslinking of collagen with dendrimers. *J Biomed Mater Res.* 2005; 75: 510-8.
86. Duan X, Sheardown H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffolds: mechanical properties and corneal epithelial cells interactions. *Biomaterials.* 2006; 27: 4608-17.
87. Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, et al. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 1869-75.
88. Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, et al. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 46-61.