



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO

Medicina Regenerativa para la Córnea.

Epitelio de la Cápsula Anterior del Cristalino como Sustituto del
Endotelio Corneal

Autor:

Carlos A Rodríguez Barrientos



Universidad de Oviedo
Universidá d'Oviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO

Medicina Regenerativa para la Córnea

Epitelio de la Cápsula Anterior del Cristalino como Sustituto del
Endotelio Corneal

Autor:

Carlos A Rodríguez Barrientos



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Medicina Regenerativa para la Córnea. Epitelio de la Cápsula Anterior del Cristalino como Sustituto del Endotelio Corneal.	Inglés: Regenerative Medicine for the Cornea. Epithelium of the Anterior Lens Capsule as a Substitute for the Corneal Endothelium.
2.- Autor	
Nombre: Carlos Alberto Rodríguez Barrientos	DNI/Pasaporte/NIE: 127 000000
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico Quirúrgicas	

RESUMEN (en español)

El endotelio corneal (EC) es una monocapa de células endoteliales (CE) densamente empaquetadas en la Membrana de Descemet (DM) y es el responsable del mantenimiento de la transparencia corneal a través de un mecanismo de bomba y de barrera. Diferentes condiciones como el trauma quirúrgico accidental, diabetes, glaucoma o la distrofia endotelial pueden comprometer la función de las CE. Como resultado de esta deficiencia puede ocurrir edema corneal, compromiso de la agudeza visual y en algunos casos ceguera corneal. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la ceguera corneal representa una de las causas más importantes de ceguera en el mundo. A pesar de que la queratoplastia penetrante es considerada el estándar de oro para tratamiento de la ceguera corneal, en años recientes la queratoplastia endotelial de membrana de Descemet (DMEK) se ha convertido rápidamente en el tratamiento preferido para reemplazar solo el endotelio corneal enfermo en lugar de reemplazar todas las capas de la córnea, sin embargo los problemas asociados con el trasplante corneal, en especial la escasez de donantes es el mayor problema, esta situación ha privado a cientos de pacientes con ceguera corneal de salvar su visión por medio de un trasplante. Los esfuerzos para promover la donación en ciertas áreas en el mundo han presentado dificultades, sobre todo asociadas a la diversidad económica y cultural. En la mayoría de los países, el bajo nivel de educación, las prácticas culturales funebres han dañado seriamente la donación. La medicina regenerativa es una rama de la investigación médica con el potencial de solventar la escasez de donantes; el uso del cultivo de las CE para obtener un sustituto del EC es una de las estrategias más prometedoras de la medicina regenerativa. Sin embargo estas estrategias tienen muchas dificultades: en cultivo las CE pueden adoptar una forma fibroblástica, falta de soportes celulares adecuados con características similares a la MD, así como el uso de sustancias de origen animal como el suero bovino y otros xenocomponentes limitan la aplicación clínica de estas estrategias. Además, en ciertas regiones del mundo como América Latina, la medicina regenerativa es un campo de investigación interdisciplinario emergente y costoso que aún enfrenta diferentes desafíos antes de llegar a esta región en el mundo. En consecuencia, el uso de tejido donante de córnea seguirá siendo una fuente insustituible para el trasplante de tejido. En este escenario, una monocapa altamente organizada de células con su membrana basal intacta, capaz de expresar marcadores específicos del EC, que pueda ser obtenido del tejido desechado de los bancos de ojos, y que no dependa de técnicas de cultivo celular in vitro, puede ser una alternativa ideal para resolver el problema de la escasez de córnea en una región como América Latina. En nuestra investigación, observamos que el epitelio del cristalino está organizado como una monocapa de células epiteliales sobre la cápsula anterior del cristalino (ECAC), además de expresar de manera natural los marcadores de bomba ($\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$) y barrera (ZO-1) que se aceptan como requisitos para un sustituto del endotelio corneal sea considerado como adecuado para ser utilizado en estrategias regenerativas; Además, muestra la expresión de otros marcadores (conexinas, acuaporinas, vimentina y moléculas de adhesión neural) que contribuyen con el transporte activo de fluidos y la función de barrera que son necesarios para mantener la transparencia en la córnea y el cristalino. El trasplante del ECAC en un modelo animal demostró la posibilidad de trasplantar esta monocapa de manera similar a un EC, permitiendo adaptar una técnica quirúrgica ampliamente utilizada por los cirujanos oftalmólogos. Nuestros hallazgos mostraron que las corneas trasplantadas son capaces de evitar la progresión de las alteraciones asociadas a la insuficiencia endotelial. Es de nuestro conocimiento que la idea de restaurar la transparencia corneal por medio del



trasplante del ECAC como u tejido subrogado nunca ha sido explorada. Este trabajo tiene un impacto en varios campos: i) Una nueva estrategia en el campo del trasplante para el reemplazo de CE enfermas, basada en el uso del ECAC como un sustituto natural del EC obtenido sin el uso de enfoques tradicionalmente *in vitro*, ii) La posibilidad de obtener dos posibles sustitutos naturales del EC de un tejido ocular que se descarta regularmente de los bancos de ojos después de la adquisición de córneas y iii) Una estrategia de investigación traslacional para resolver el problema de la falta de donantes. Por lo tanto, con esta estrategia es posible obtener dos CE y dos sustitutos de CE de un solo donante. Con el objetivo de resolver la crisis del donante corneal, un donante podría beneficiar a cuatro pacientes.

RESUMEN (en Inglés)

The corneal endothelium (CE) is a densely packed confluent monolayer of corneal endothelial cells (CEC) on Descemet's membrane (DM), responsible for maintaining the hydration of the cornea through a pump leak mechanism and carries out a barrier function. Different conditions such as accidental or surgical trauma, diabetes, glaucoma or endothelial dystrophy can compromise the function of CEC. As a result of this deficiency corneal edema, impaired visual acuity and in some cases corneal blindness occur. According to the World Health Organization, corneal blindness represents one of the most important causes of blindness in the world. Despite penetrating keratoplasty being considered the gold standard for treatment of corneal blindness, in recent years Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) has rapidly become in the preferred treatment to replace only the diseased CE instead of a full corneal thickness replacement; however, problems associated with corneal transplantation, especially the lack of donors is still the major problem, this situation have deprived thousands of patients with corneal blindness from a sight saving transplant. The efforts to promote corneal donation in Latin America have been difficult due primarily to the cultural and economic diversity. In most countries, the low level of educational, cultural funeral practices and public awareness have hampered donation. Regenerative medicine is a recent area of medical research with the potential to solve the problem of lack of donors; the use of cultured CEC to obtain an engineered CE substitute represents one of the promising approaches for regeneration of cornea. However, this strategy faces several difficulties: in culture, CEC can be passaged only a limit number of times before they adopt a fibroblastic-like morphology, the selection of an adequate scaffold with similar characteristics to DM, the use of fetal bovine serum and other xenocomponents to promote mitosis limit its clinical application. On the other hand, for most of the countries of Latin America, regenerative medicine is an emerging and costly interdisciplinary field of research that still faces different challenges before it reaches this region in the world. In consequence, the use of cornea donor tissue will remain as irreplaceable source for tissue transplantation. In this scenario, a highly organized monolayer of cells with its intact basal membrane, shared key specific markers with CE, which comes from discarded tissue from eye banks, and does not depend of *in vitro* cell culture techniques, may be an ideal alternative to solve the problem of cornea shortages in a region as Latin America. In our research, we observe that lens epithelium (LE) is organized as a monolayer of lens epithelial cells (LEC) on anterior lens capsule (ALC), it naturally express not only the pump-leak markers (Na^+K^+ /ATPase and ZO-1) that are accepted as requisites for an adequate CE substitute to be used in regenerative strategies; also, it shows expression of other markers (connexin, aquaporin, vimentin and neural cell adhesion molecules) that contribute with the active fluid transport and barrier function that are necessary to keep the transparency in the cornea and lens. The LE transplantation in an animal model demonstrated the possibility of transplanting this monolayer in a similar way to a CE, allowing to adapt a surgical technique widely used by ophthalmologist surgeons. Our findings showed that the transplanted corneas are able to prevent the progression of alterations associated with endothelial insufficiency. The use of LE enables the possibility to have a natural CE substitute obtained without the need of traditional culture approaches used for the construction of an engineered endothelium. An additional advantage is due to the use of a cell sheet monolayer that came from a source that is derived from the same intraocular environment and light adapted, such as CE. The possibility of using an ocular tissue that naturally expresses key specific corneal endothelial markers and that came from a source that is regularly discarded in eye banks after procurement of corneas from donors, provides a novel strategy in the field of transplantation for replacement of diseased CE. To continue with our research, at this moment we are working in pre-clinical experiments to prove the efficacy of LE to recover the corneal transparency in a corneal endothelial insufficiency animal model. In our knowledge, the idea to restore the corneal transparency using the LE as surrogate tissue has never been explored. This work has an impact in



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

several fields: i) A novel strategy in the field of transplantation for replacement of diseased CE, based on the use of LE as a natural CE substitute obtained without the use of traditionally *in vitro* approaches, ii) The possibility of obtaining two potential natural CE substitutes from an ocular tissue that is regularly discarded from eye banks after procurement of corneas and iii) A translational research strategy to solve the problem of lack of donors. Thus, with this strategy it is possible to obtain two CE and two CE substitutes from a single donor. With the aim of solving the corneal donor crisis, one donor could benefit four patients.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

A mi madre, a mis hermanas y a Emilia

"La ciencia es sin disputa el mejor, el más brillante adorno del hombre"

Gaspar Melchor de Jovellanos

Agradecimientos

Este trabajo es la suma del esfuerzo de muchas personas. A todos mi más profundo agradecimiento.

A mi Director de tesis y mentor, Dr Jesús Merayo Lloves, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, que de no ser por usted, no estaría donde me encuentro ahora. Gracias por su paciencia y por enseñarme que "Avanti" es el principio de muchas cosas.

Al Dr. Álvaro Meana, por su pasión en su trabajo y por la inspiración que hace crecer en quienes trabajamos con él, gracias por mostrarme cosas nuevas.

A Natalia y Manu, por ser ejemplo de trabajadores inalcanzables, gracias por su paciencia y tiempo dedicado. De ustedes me llevo la enseñanza de un trabajo bien hecho.

A Susana, por su disposición de enseñarme y tenerme paciencia, gracias por tu ayuda.

A mis compañeros de laboratorio en la FIO, en especial a Mairobi, gracias por acompañarme todo este tiempo.

Al Dr. Virgilio Galvis y al Dr. Tello por la oportunidad de trabajar con ustedes en FOSCAL, gracias por la oportunidad y el apoyo a mi persona. A la Dra. Martha Arango, en el Banco Multitejidos y Terapias Avanzadas de FOSCAL Internacional, sois un gran ejemplo de profesionalismo y humildad, gracias por lo enseñado y en especial por su tiempo.

A la Dra Carmen Barraquer y a la Dra Ángela María Gutiérrez, por su labor investigadora y sobre todo por permitir que la Clínica Barraquer sea mi nuevo hogar.

A mi madre, a mis hermanas y a Emilia, por su amor y apoyo incondicional.

A la Familia Fernández-Vega, a todo el personal del Instituto Oftalmológico Fernández Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica y Universidad de Oviedo, porque sin su apoyo a la investigación esto no sería posible. Gracias a los que colaboraron de una u otra forma en la realización de este trabajo.

Lista de abreviaturas

CEC	Células endoteliales corneales.	Pag 1
DMEK	Queratoplastia endotelial de membrana de Descemet.	1
ECAC	Epitelio de la capsula anterior del cristalino.	3
MD	Membrana de Descemet.	1
MB	Membrana de Bowman.	8
COL	Colágeno.	9
ZO-I	Zonula occludens-I.	10
Na+K+/ATPasa	Bomba sodio-potasio ATPasa.	10
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas.	10
TGF- β	Factor de crecimiento transformador beta.	11
QB	Queratopatía bullosa.	11
SBF	Suero bovino fetal.	16
NCAM	Molécula de adhesión celular neural.	16
AQP	Acuaporina.	16
Cx	Conexina.	16
CAC	Cápsula anterior del cristalino.	17
GMP	Buenas prácticas de manufactura.	19
PN	Placa neural.	22
EPP	Ectodermo pre-placoda.	22
CN	Cresta neural.	22
VO	Vesícula óptica.	22
PC	Placoda.	22
VC	Vesícula del cristalino.	22
FC	Fibras del cristalino.	22

CCN	Células de la cresta neural.	22
H&E	Hematoxilina-eosina.	8
ZG	Zona germinativa.	22
BSS	Solución salina balanceada.	29
PBS	Solución salina balanceada.	29
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.	50
SEC	Sustituto del endotelio corneal.	15
ATEC	Área de tinción epitelial corneal.	64
ECC	Espesor central corneal.	64
TCO	Tomógrafo de coherencia óptica.	65
CV	Coeficiente de variación.	64

Lista de figuras

Figura 1	Sistema de la superficie ocular.	Pag 6
Figura 2	Componentes de la película lagrimal.	7
Figura 3	Aspecto normal de la córnea.	8
Figura 4	Estructura de la córnea.	8
Figura 5	Mecanismo de bomba y barrera a través del endotelio corneal.	10
Figura 6	Regulación del ciclo celular en las CEC.	11
Figura 7	Comparación macro y microscópica de una córnea normal vs patológica.	13
Figura 8	Procedimientos de queratoplastia corneal.	14
Figura 9	Metodología para cultivo de CEC.	16

Figura 10	Aspecto de las CEC en cultivo.	17
Figura 11	Sustitutos del endotelio corneal obtenidos por ingeniería de tejidos.	18
Figura 12	Aspecto morfológico de monocapas celulares formadas por diferentes fenotipos de las CEC.	21
Figura 13	Desarrollo embriológico del ojo desde la PN hasta la formación del cristalino y la córnea.	23
Figura 14	Estructura del segmento anterior del ojo.	24
Figura 15	Estructura tridimensional de las CEC y de las células del ECAC.	25
Figura 16	Citoarquitectura del cristalino.	26
Figura 17	Absorción del espectro electromagnético por la córnea y el cristalino.	27
Figura 18	Distribución de los donantes en función del género.	30
Figura 19	Distribución de los donantes en función del rango de edad.	31
Figura 20	Distribución de los donantes en función del género y rango de edad.	31
Figura 21	Distribución de los donantes en función del tipo de muerte.	32
Figura 22	Distribución de los donantes en función del género y el tipo de muerte.	32
Figura 23	Porcentaje de donantes en función del tiempo (horas) de captación del tejido.	33
Figura 24	Distribución de los donantes en función de la claridad corneal del tejido.	33
Figura 25	Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia de: ictericia escleral, pterigion, arco senil e infiltrados en limbo o estroma.	34
Figura 26	Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia de: opacidades, cuerpos extraños, signos de ectasia y evidencia de cirugía refractiva.	34
Figura 27	Distribución de los donantes en función de la presencia del defecto epitelial entre: 0; 1-20; 21-40; 41-60 y 61-100%.	35

Figura 28	Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia (leve, moderado o severo) de: pliegues de MD, pliegues estromales, guttas centrales, guttas periféricas y opacidad estromal.	35
Figura 29	Espesor corneal (μm) en función del rango de edad de los donantes: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.	36
Figura 30	Densidad celular endotelial (CEC/ mm^2) en función del rango de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.	36
Figura 31	Tamaño de las CEC (μm^2) en función del rango de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.	37
Figura 32	Porcentaje de donantes en función de la presencia o ausencia de: pleomorfismo y polimegatismo.	37
Figura 33	Porcentaje de donantes en función de: i) tamaño, 200-299; 300-399; 400-499 y 500-599 μm^2 y ii) densidad celular, <2400; 2400-3400 y >3400 CEC/ mm^2 .	38
Figura 34	Microscopia de contraste de fase del ECAC humana sobre la CAC.	38
Figura 35	Microscopia de contraste de fase de las CEC humana sobre la MD.	39
Figura 36	Microscopia electrónica del ECAC.	40
Figura 37	Microscopia electrónica de las CEC.	41
Figura 38	Inmunohistofluorescencia para ZO-I.	51
Figura 39	Inmunohistofluorescencia para Na^+K^+ /ATPasa.	52
Figura 40	Inmunohistofluorescencia para Cx43.	52
Figura 41	Inmunohistofluorescencia para VIM.	53
Figura 42	Inmunohistofluorescencia para AQP-1.	54
Figura 43	Inmunohistofluorescencia para NCAM.	54
Figura 44	Inmunohistofluorescencia para COLI V.	55
Figura 45.	Análisis de expresión relativa de RNAm de Na^+K^+ /ATPasa/ACTH en las CEC y ECAC.	
Figura 46.	Análisis de expresión relativa de RNAm de ZO-I/ACTH en las CEC y ECAC.	

Figura 47	Métodos utilizados con frecuencia para el desarrollo de insuficiencia endotelial.	60
Figura 48	Descemetorrexis quirúrgica.	61
Figura 49	Espátula endotelial.	62
Figura 50	Procedimiento de descemetorrexis quirúrgica bajo burbuja de aire	63
Figura 51	Clasificación clínica del grado de opacidad corneal.	65
Figura 52	Clasificación clínica de ATEC.	65
Figura 53	Aspecto clínico del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-operatorios.	68
Figura 54	Cambios en el ECC en el los días pre- y post-operatorios.	70
Figura 55	Mediciones del diámetro corneal en el los días pre- y post-operatorios.	71
Figura 56	Aspecto morfológico de las CEC en el EC central en los días pre- y post-operatorio.	71
Figura 57	Análisis cuantitativo de las características de las CEC en el EC central en los días pre- y post-operatorio.	72
Figura 58	Hallazgos histopatológicos en una córnea normal y al día 28 del post-operatorio.	74
Figura 59	Técnica de preparación del endotelio corneal previo al trasplante mediante la técnica de DMEK.	79
Figura 60	Trasplante del endotelio corneal mediante técnica de DMEK.	80
Figura 61	Obtención del cristalino donante y preparación de la CAC.	82
Figura 62	Trasplante de la CAC por medio de técnica DMEK.	83
Figura 63	Vista general del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-trasplante del EC.	86
Figura 64	Sección óptica del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-trasplante del EC.	87
Figura 65	Área de tinción epitelial corneal en los días pre- y post-trasplante del EC.	88
Figura 66	Cambios de ECC en los días pre- y post-trasplante del EC.	89

Figura 67	Análisis cuantitativo del diámetro corneal en los días pre- y post-trasplante del EC.	90
Figura 68	Análisis histopatológico post-trasplante del EC con las células epiteliales orientadas hacia la cámara anterior del ojo.	92
Figura 69	Análisis histopatológico post-trasplante del EC con las células epiteliales orientadas hacia el estroma receptor.	97

Lista de tablas

Tabla 1	Proteínas especializadas en la membrana de las CEC.	48
Tabla 2	Secuencia de primer utilizados para el gen Na^+K^+ /ATPasa, ZO-1 y ACTB	

Índice

Planteamiento del problema	Pag 1
Justificación	3
Hipótesis	4
Objetivos	4
Estructura de la tesis	5
Capítulo 1. Reseña del estado del arte	6
1.1 Superficie ocular	6
1.2 Córnea	7
1.2.1 Epitelio	9
1.2.2 Estroma	9
1.2.3 Endotelio	9
1.3 Queratopatía bullosa	11
1.3.1 Definición	11
1.3.2 Impacto en la calidad de vida	12
1.3.3 Cambios patológicos, manifestaciones clínicas y diagnóstico	12
1.3.4 Tratamiento	13
1.4 Nuevos abordajes terapéuticos	15
1.4.1 CEC	15
1.4.2 Técnicas de cultivo celular	15
1.4.3 Soportes celulares	17
1.4.4 Poblaciones celulares de fuentes extra-oculares	18

Capítulo 2. Características epidemiológicas de los donantes de tejidos oculares y estudio morfológico de las células del ECAC y CEC.	21
2.1 Introducción	21
2.1.1 Aspectos embriológicos y anatómicos de las células del ECAC y de las CEC	22
2.1.2 Estructura y organización de las células del ECAC y de las CEC	24
2.1.3 Membranas basales del ECAC y de las CEC	25
2.1.4 Ambiente intra-ocular de las células del ECAC y de las CEC	26
2.2 Materiales y métodos	28
2.2.1 Donantes	28
2.2.2 Muestras	28
2.2.3 Procesamiento de las muestras	29
2.2.4 Análisis morfológico de las células del ECAC y CEC	29
2.2.4.1 Microscopía de contraste de fases	29
2.2.4.2 Microscopía electrónica	29
2.2.5 Análisis estadístico	30
2.3 Resultados	30
2.3.1 Características demográficas de los donantes	30
2.3.2 Características del tejido donado mediante exploración con lampara de hendidura	33
2.3.3 Características del tejido donado mediante exploración con microscopía especular	36
2.3.4 Características morfológicas del ECAC sobre CAC y de las CEC sobre MD mediante microscopía de contraste de fase	38
2.3.5 Características morfológicas del ECAC sobre CAC y de las CEC sobre MD mediante microscopía electrónica.	39

2.4	Discusión	41
2.5	Conclusión	44
	Capítulo 3. Caracterización de los marcadores estructurales y funcionales de las CEC en las células del ECAC y expresión génica de marcadores de “bomba y barrera “de las CEC en las células del ECAC	45
3.1	Introducción	45
3.1.1	Proteínas de unión célula-célula	45
3.1.1.1	ZO-1	45
3.1.1.2	Cx	46
3.1.1.3	NCAM	46
3.1.2	Proteínas de transporte	46
3.1.2.1	Na ⁺ K ⁺ /ATPasa	46
3.1.2.2	AQP	46
3.1.3	Proteínas del citoesqueleto	47
3.1.3.1	Red de actina-miosina	47
3.1.3.2	VIM	47
3.2.4	Proteínas de unión a la matriz extracelular	47
3.2	Materiales y métodos	49
3.2.1	Donantes	49
3.2.2	Preparación de las muestras	49
3.2.3	Análisis por inmunohistofluorescencia	50
3.3	Resultados	51

3.4	Discusión	55
3.5	Conclusión	57
	Capítulo 4. Modelo pre-clínico de QB en conejo blanco de Nueva Zelanda para trasplante de sustitutos del endotelio corneal.	60
4.1	Introducción	60
4.2	Materiales y métodos	62
4.2.1	Animales	62
4.2.2	Elaboración de la espátula endotelial	62
4.2.3	Procedimiento quirúrgico	62
4.2.4	Evaluación pre- y post-operatoria	64
4.2.4.1	Transparencia corneal	64
4.2.4.2	ATEC	65
4.2.4.3	ECC	65
4.2.4.4	Diámetro corneal	66
4.2.4.5	Características morfológicas de las CEC	66
4.2.4.6	Tejido animal	67
4.2.4.7	Análisis histológico	67
4.2.5	Análisis estadístico	67
4.3	Resultados	67
4.3.1	Transparencia corneal y ATEC	67
4.3.2	ECC	69
4.3.3	Diámetro corneal	70
4.3.4	Características morfológicas de las CEC	71

4.3.5 Análisis histológico	73
4.4 Discusión	75
4.5 Conclusión	78
Capítulo 5. Trasplante del ECAC mediante técnica DMEK en un modelo animal de QB	79
5.1 Introducción	79
5.2 Materiales y métodos	81
5.2.1 Donantes	81
5.2.2 Preparación del ECAC	81
5.2.3 Trasplante del ECAC en un modelo animal de QB	82
5.2.4 Evaluación clínica pre- y post-operatoria	83
5.2.5 Transparencia corneal	84
5.2.6 Tinción epitelial corneal	84
5.2.7 ECC	84
5.2.8 Diámetro corneal	85
5.2.9 Análisis histológico	85
5.3 Resultados	86
5.3.1 Transparencia corneal	86
5.3.2 ECC	88
5.3.3 Diámetro corneal	90
5.3.4 Análisis histológico	91

5.4 Discusión	93
5.5 Conclusiones	96
Capítulo 6. Trabajo futuro. Trasplante del ECAC con las células orientadas hacia el estroma receptor.	97
Capítulo 7. Conclusiones de los capítulos	99
Capítulo 8. Actividades durante el PhD 2014-2019	99

Planteamiento del problema

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades corneales representan la segunda causa de ceguera mundial, con aproximadamente 6.9 millones de personas afectadas por esta condición [1,2], de los cuales una parte importante se encuentra asociado a una pérdida irreversible de las células endoteliales corneales (CEC), causada principalmente por traumatismos durante procedimientos de cirugía intraocular [3] o por desórdenes genéticos como la distrofia de Fuchs [4]. Independiente de la etiología, el daño de las CEC trae como consecuencia la opacificación de la córnea y por tanto el compromiso de la visión.

Las limitaciones físicas y las implicaciones psicosociales de la pérdida de la visión pueden ser difíciles de estimar. Sin embargo, es evidente que disminuye la calidad de vida no solo de la persona afectada sino también la de su familia [5]. Una persona con compromiso de la visión se enfrenta a grandes desafíos sociales afectando muchas de las actividades que se realizan diariamente, entre ellas su capacidad laboral [5]. A esto se añade una pérdida de la autovalencia, autoestima y la aparición de síntomas relacionados con depresión [6].

En la actualidad el único tratamiento disponible para remplazo de las CEC dañadas es el trasplante corneal, ya sea mediante queratoplastia penetrante para el remplazo de todas las capas de la córnea, o por medio de técnicas más selectivas como la queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet (DMEK) para remplazo solo del endotelio corneal dañado. Sin embargo, a pesar de los avances en el tratamiento quirúrgico para restitución de la función endotelial, la escasez de donantes de córnea representa la mayor limitante de estas estrategias, en particular en países de América Latina.

Como alternativa a este problema, la ingeniería de tejidos plantea prometedoras estrategias basadas en la elaboración de sustitutos del endotelio corneal a partir de la proliferación de las CEC sobre diversos soportes celulares con características similares a la membrana de Descemet (MD) [7–10]. A su vez, el trasplante de algunos de estos sustitutos en modelos animales de insuficiencia endotelial han demostrado la restitución de la función endotelial y por tanto de la transparencia corneal [8,11,12]. Sin embargo, la

mayoría de estos abordajes se basan en el uso de sustancias de origen animal (xenogénicos) que durante años han sido consideradas como inapropiadas por los serios cuestionamientos éticos y científicos relacionados [13]. A su vez, estos procedimientos conllevan altos costo de producción y presentan escasa reproducibilidad entre los estudios; encontrándose por lo tanto aún en fase experimental, factores que limitan la posibilidad cercana de ser utilizados en estudios clínicos.

En este escenario, la obtención de un tejido sustituto que exprese de manera natural características similares al endotelio y que conlleve a la restitución de la transparencia corneal al ser trasplantado mediante la técnica DMEK, sería una alternativa terapéutica ideal para dar solución a los problemas de: i) escasez de donantes y ii) cuestionamientos éticos y de bio-seguridad alrededor de los abordajes de la medicina regenerativa tradicional. De esta manera se contaría con un novedoso abordaje terapéutico que permitiría llevar a cabo estudios clínicos de manera más pronta.

Justificación

Actualmente, los abordajes tradicionales de medicina regenerativa contribuyen de manera escasa al tratamiento de pacientes con ceguera corneal, ya que la metodología en la que se basan conlleva a que los tejidos obtenidos se consideren solo para fines de investigación, mas no para uso clínico [14]. La modificación de aspectos como el uso de sustancias de origen animal para la obtención de sustitutos de endotelio corneal, podría acelerar el desarrollo de estrategias más idóneas con fines clínicos. Sin embargo, a la fecha no ha sido posible desarrollar una metodología que cumpla con este requisito, y que a su vez, no implique los elevados costos asociados a las técnicas de medicina regenerativa.

En consecuencia, el desarrollo de una estrategia libre de sustancias xenogénicas y sin necesidad de las técnicas *in vitro* de la medicina regenerativa es relevante y necesaria. Por lo tanto, en el presente proyecto se propone usar el epitelio de la cápsula anterior del cristalino (ECAC), como un sustituto del endotelio corneal, debido a su similitud con este tejido en cuanto a sus características estructurales y funcionales. La ventaja de esta estrategia radica en: i) la obtención de una monocapa celular semejante al endotelio corneal, a partir de un tejido intraocular considerado de desecho posterior a la obtención del botón central de la córnea para trasplante, ii) no requerimiento de componentes xenogénicos y iv) capaz de ser trasplantada mediante la técnica DMEK.

Es de resaltar que con esta estrategia terapéutica a partir de un donante de tejido ocular, se podrían obtener dos sustitutos de endotelio corneal, además de los dos endotelios obtenidos de manera regular. De esta manera un donante podría beneficiar a cuatro pacientes, contribuyendo así a resolver la escasez de tejidos disponibles para trasplante.

Hipótesis

Las células del ECAC y las CEC comparten la expresión de marcadores asociados al mantenimiento de la transparencia corneal, por lo tanto, el trasplante del ECAC ofrece un beneficio terapéutico similar al obtenido con el trasplante del endotelio corneal mediante la técnica DMEK.

Objetivos

General

Demostrar que el ECAC puede ser considerado como un sustituto del endotelio corneal, por su similitud con las CEC sobre la MD.

Específicos

1. Determinar las características epidemiológicas de los donantes de tejido ocular y realizar un estudio morfológico de las CEC y células del ECAC en sus respectivas membranas basales.
2. Evaluar la presencia de los marcadores estructurales y funcionales de las CEC en las células del ECAC y determinar la expresión génica de marcadores de "bomba y barrera" de las CEC en las células del ECAC.
3. Desarrollar un modelo animal de queratopatía bullosa en conejo blanco de Nueva Zelanda.
4. Evaluar el efecto del ECAC al ser trasplantado por medio de la técnica de DMEK en el modelo animal de queratopatía bullosa.

Estructura de la tesis

En esta tesis se plantean los siguientes apartados:

1. Reseña del estado del arte relevante para esta tesis.
2. Análisis de las características epidemiológicas de los donantes de tejido ocular y estudio morfológico de las CEC y células del ECAC en sus respectivas membranas basales.
3. Descripción de la presencia de los marcadores estructurales y funcionales de las CEC en las células del ECAC y evaluación de la expresión génica de marcadores específicos de las CEC en las células del ECAC.
4. Descripción del modelo animal de queratopatía bullosa en conejo blanco de Nueva Zelanda.
5. Efecto terapéutico del ECAC al ser trasplantado por medio de la técnica de DMEK en el modelo animal de queratopatía bullosa.
6. Perspectiva del trabajo a futuro.
7. Conclusiones de los capítulos.
8. Actividades académicas realizadas durante el programa doctoral en el periodo 2014-2019

1

Reseña del estado del arte

1.1 Superficie ocular

La córnea no es un tejido aislado y forma junto con la esclera la cubierta externa del ojo, al ser una estructura transparente que permite el paso de la luz juega un papel central en la visión; mientras que la esclera forma una caja oscura que permite la formación de la imagen sobre la retina. La esclera de características opacas se encuentra recubierta por un tejido semitransparente conocido como conjuntiva [15].

El mantenimiento y protección de la transparencia corneal es la principal función del sistema de la superficie ocular, el cual incluye: i) la superficie externa de la córnea, ii) el epitelio de la conjuntiva, iii) la glándula lagrimal principal, iv) las glándulas accesorias (Krause, Wolfring y Meibomio) y el iv) conducto nasolagrimal. Todos los componentes del sistema de la superficie ocular participan en la producción de las capas de la película lagrimal, que además de proteger las estructuras oculares tiene también propiedades refractivas que contribuyen a la visión (Fig 1) [16].

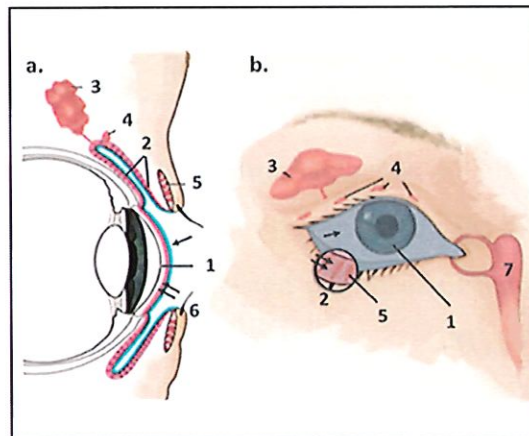


Figura 1. Sistema de la superficie ocular. (a) Sección sagital y (b) vista frontal de la superficie ocular que muestra (color rosa) la continuidad del epitelio en: (1) córnea, (2) conjuntiva, (3) glándula lagrimal, (4) glándulas accesorias: Krause, Wolfring, y (5) Meibomio. Cada región especializada contribuye a la formación de (color azul) la película lagrimal. También se observan las (6) pestañas y el (7) conducto nasolagrimal. Figura adaptada de [17].

La glándula lagrimal y las accesorias de Krause y Wolfring secretan agua a manera de lágrimas para formar una capa acuosa, las glándulas de Meibomio producen una capa lipídica que previene la evaporación de la lágrima, mientras la superficie externa de la córnea y el epitelio de la conjuntiva producen una capa de mucinas hidrofílicas que mantienen las lágrimas en la superficie del ojo (Fig 2), a su vez el conducto nasolagrimal está encargado de mantener un nivel apropiado de lágrimas. Todas las funciones del complejo de la superficie ocular están integradas por la inervación del trigémino que es necesario para el funcionamiento normal del sistema [16,17].

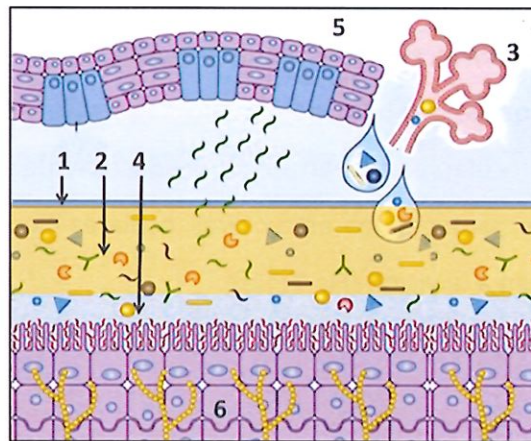


Figura 2. Componentes de la película lagrimal. (1) Capa lipídica secretada por las glándulas de Meibomio, (2) capa acuosa secretada por las (3) glándulas lagrimal, Krause y Wolfring, y (4) capa de mucina secretada por el (5) epitelio de la conjuntiva y de la (6) córnea. Figura adaptada de [18].

1.2 Córnea

Es el mayor componente refractivo del ojo, su curvatura y transparencia contribuyen con 43.25 de las 58.60 dioptrías del ojo humano (Fig 3) [19]. Es un tejido avascular cubierto en la parte anterior por la película lagrimal y bañado en la cara posterior por el humor acuoso. En un adulto promedio su diámetro horizontal es de 11-12 mm, vertical de 10-11 mm y un espesor en la parte central de 500 μm aproximadamente, el cual se incrementa de manera gradual en la periferia [20].

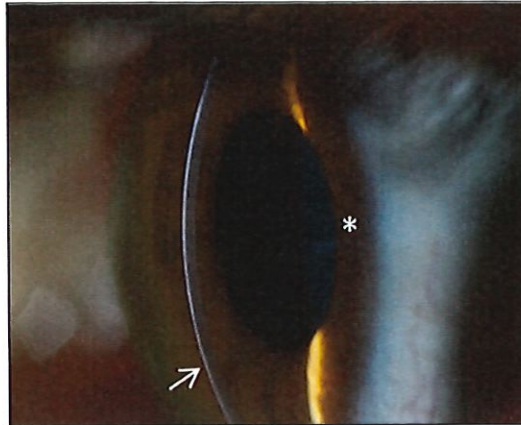


Figura 3. Aspecto normal de la córnea. Exploración con lámpara de hendidura sobre la superficie corneal, en la que se aprecia: el contorno convexo (flecha) y la transparencia que permite visualizar los detalles del iris (asterisco). Figura adaptada de [21].

La estructura histológica de la córnea está formada por cinco capas: el epitelio, la membrana de Bowman (MB), el estroma, la MD y las CEC. Todos los componentes interactúan entre ellos para formar una estructura tridimensional (Fig 4) [22].

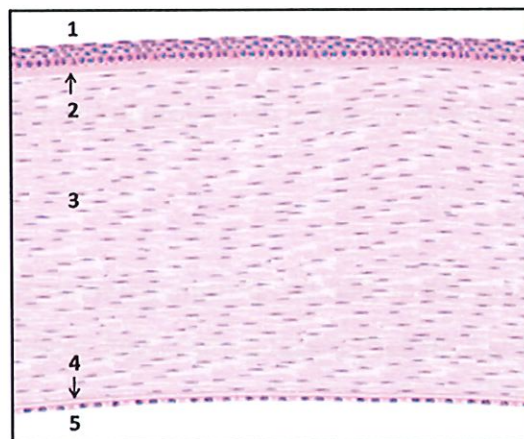


Figura 4. Estructura de la córnea. Corte histológico con tinción de hematoxilina & eosina (H&E) en el que se muestran las distintas capas corneales: (1) epitelio, (2) MB, (3) estroma, (4) MD, y (3) CEC. Figura adaptada de [23].

1.2.1 Epitelio

Consiste en células no escamosas dispuestas en 5-6 capas, representa entre 40-50 μm del espesor total de la córnea y junto con la película lagrimal forman no solo una estructura óptica, sino también una barrera que previene la sobre-hidratación del estroma [20]. Las células del epitelio corneal se encuentran en contacto directo con la MB, de aproximadamente 12 μm de espesor y compuesta de colágenos tipo I y III. La proliferación y diferenciación continua de la población de células madre de la región del limbo dan origen a las capas superficiales del epitelio corneal [16,22].

1.2.2 Estroma

Representa alrededor del 80-85% del espesor total de la córnea, consiste en una malla de fibras de colágeno tipo I y IV empaquetadas en capas denominadas lamelas, e incluidas en una matriz extracelular de proteoglicanos (decorina y lumican) [19]. Los queratocitos son las células características del estroma y están encargados de la síntesis y el remodelamiento de las lamelas. La cito-arquitectura característica de esta matriz de colágeno contribuye a minimizar la desviación de la luz y a mantener la transparencia corneal, la cual depende de un adecuado contenido de agua en el estroma (78%), y que está determinado por la actividad fisiológica del endotelio corneal.

1.2.3 Endotelio

Está formado por una monocapa de CEC de aproximadamente 18-20 μm de diámetro y 5 μm de espesor, su densidad celular normal es de 3,500 células/ mm^2 y en condiciones normales existe una pérdida celular anual del 0.6% [22]. Estas células se disponen en una morfología característica de panal de abeja sobre la MD, la cual actúa como una capa elástica compuesta por colágeno tipo VIII [24,25] y colágeno tipo IV, este último permite la adherencia de la MD con las CEC al estroma posterior [26].

La función principal del endotelio es el mantenimiento de la transparencia corneal a partir de la regulación de la hidratación mediante un mecanismo denominado de “bomba y barrera” en las CEC. La función de barrera está determinada por las uniones celulares estrechas tipo zonula occludens-I (ZO-I) en la membrana apical de las CEC [22]. Esta

barrera limita la tendencia natural del humor acuoso a desplazarse dentro del estroma, inducido por la elevada concentración de colágeno en las lamelas y glicosaminoglicanos en la matriz extracelular [23,27]. Como balance al movimiento de líquido, una elevada densidad de bombas $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$ se encuentran en la membrana baso-lateral de las CEC, formando un mecanismo que mueve el líquido del estroma a la cámara anterior del ojo (Fig 5) [27,28]. La actividad en conjunto de la ZO-1 y las bombas $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$, contribuyen al mantenimiento del transporte correcto de líquidos a través de las lamelas de colágeno para mantener una turgencia normal en el estroma [28,29].

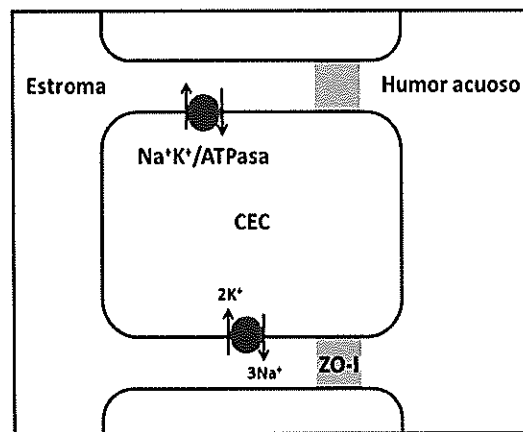


Figura 5. Mecanismo de bomba y barrera a través del endotelio corneal. La ZO-1 se localiza en la membrana apical de las CEC donde cumple la función de “barrera”; mientras la $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$ se localiza en la membrana baso-lateral donde cumplen la función de “bomba”. Figura adaptada de [29].

En condiciones normales, las CEC se encuentran arrestadas en la fase G_0 del ciclo celular y no proliferan *in vivo*. [30]. Los mecanismos moleculares que mantienen este estado quiescente ocurren por control de los complejos ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDKs) a partir de: i) la inhibición por contacto célula-célula [31], ii) la inhibición mitótica inducida por el TGF- β en el humor acuoso iii) los fenómenos relacionados con senescencia y iv) el daño oxidativo (Fig 6) [32].

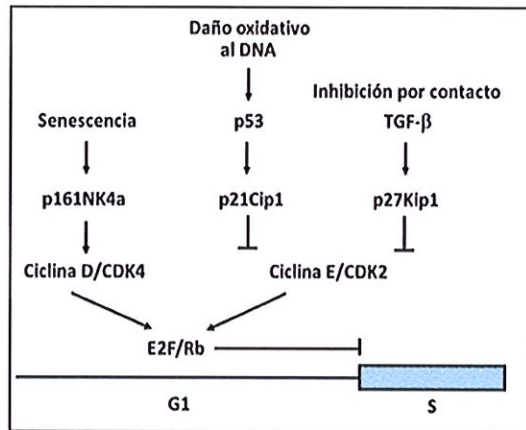


Figura 5. Regulación del ciclo celular en las CEC. La inhibición por contacto célula-célula, la presencia de TGF- β , los mecanismos asociados a la senescencia y daño oxidativo determinan el control de los complejos ciclina-CDKs que ocasionan arresto del ciclo celular. Figura adaptada de [33].

En respuesta a este estado no proliferativo, el principal mecanismo para el remplazo de células dañadas involucra el alargamiento y la migración de las CEC vecinas al área de lesión [34], resultando en un incremento en el coeficiente de variación del área celular (polimegatismo) y una disminución en el porcentaje de hexagonalidad (polimorfismo) [35]. A pesar del estado de arresto de las CEC, estas pueden dividirse en cultivo celular bajo condiciones adecuadas [33,36].

1.3 Queratopatía bullosa

1.3.1 Definición

La queratopatía bullosa (QB) es una condición patológica debida a la pérdida de CEC que ocasiona el fracaso de la función de “bomba y barrera”, resultando en una opacidad de la córnea y compromiso de la visión [37]. Actualmente, una causa importante de esta condición son: (i) las endoteliopatías primarias, entre las que se encuentra la distrofia de Fuchs y ii) las endoteliopatías secundarias, causadas por el uso de lentes de contacto [38], enfermedades crónicas como glaucoma [39] y traumatismo accidental [40]. La estimación exacta del número de personas afectadas por esta condición es un proceso complicado y

el número real podría ser considerablemente mayor si se incluyen situaciones como la queratopatía bullosa secundaria a la pérdida de CEC tras cirugía de catarata [3], actualmente considerado el procedimiento quirúrgico más frecuente en oftalmología [41].

1.3.2 Impacto en la calidad de vida

Las limitaciones físicas y las implicaciones psicosociales del compromiso de la visión pueden ser difíciles de estimar. Sin embargo, es evidente que disminuye la calidad de vida no solo de la persona afectada sino también la de su familia [5]. Una persona con compromiso de la visión se enfrenta a grandes desafíos sociales afectando muchas de las actividades que se realizan diariamente, entre ellas su capacidad laboral [5]. A esto se añade una pérdida de la autovalencia, autoestima y la aparición de síntomas relacionados con depresión [6].

1.3.3 Cambios patológicos, manifestaciones clínicas y diagnóstico

Cuando la densidad celular del endotelio corneal disminuye hasta un punto crítico se compromete el funcionamiento de los mecanismos normales de “bomba y barrera”. Secundario a la pérdida de células por daño endotelial, se observa polimegatismo y pleomorfismo de las CEC adyacentes al área de lesión como mecanismo compensador, sin embargo estos cambios también favorecen la disrupción y alteración de las ZO-1 y las bombas $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$, resultando en edema corneal por el control inadecuado de líquidos [42].

Las manifestaciones clínicas dependerán de la severidad de la enfermedad, siendo el compromiso de la agudeza visual por opacificación de la córnea la más notable. No obstante, algunas alteraciones como los cambios morfológicos de las CEC son las primeras lesiones en ser detectadas incluso antes de que el paciente se vuelva sintomático.

El diagnóstico de QB debe sospecharse ante la presencia de: pérdida de la transparencia corneal, reducción de la densidad celular endotelial, presencia de polimegatismo y pleomorfismo, así como un incremento del espesor corneal por edema del estroma (Fig

7). El estadio avanzado de la enfermedad se encuentra caracterizado por un espectro de alteraciones corneales que incluyen: i) bullas epiteliales o sub-epiteliales, ii) ruptura de la membrana basal sub-epitelial, iii) vascularizaciones y iv) fibrosis [43,44].

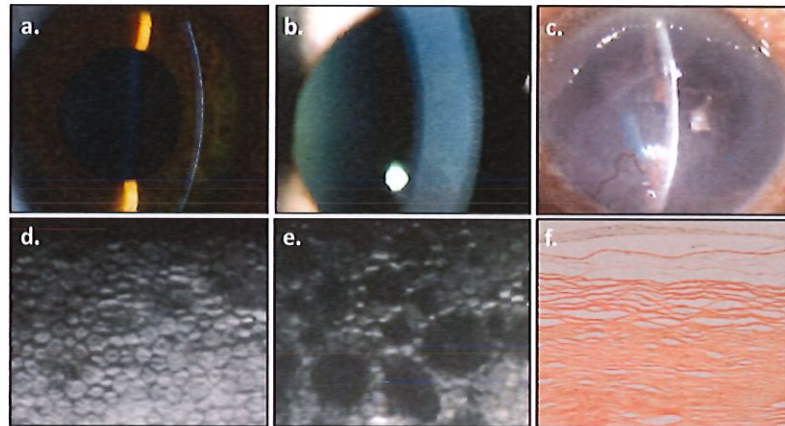


Figura 7. Comparación macro y microscópica de una córnea normal vs. patológica. (a) Córnea normal con un (d) endotelio con morfología característica en panal de abeja; (b) córnea edematosa con un (e) endotelio corneal con áreas denudadas (guttas) características de la distrofia de Fuch; (c) córnea con QB en estadio avanzado, se observa (f) separación del epitelio, edema estromal y formación de tejido fibroso. Figura adaptada de [21] [43]

1.3.4 Tratamiento

En la actualidad el trasplante de tejido corneal de donante cadavérico sano son la única opción terapéutica disponible para remplazo de las CEC dañadas, a través de los procedimientos quirúrgicos de: i) queratoplastia penetrante, ii) queratoplastia endotelial o iii) queratoprótesis (Fig 8).

La queratoplastia penetrante involucra el remplazo de todas las capas de la córnea y es considerada el procedimiento estándar para el tratamiento de la ceguera corneal [45,46]. Dentro de las queratoplastias endoteliales se encuentra: la técnica DMEK, en la que solo las CEC y la MD son trasplantadas [47]. En la actualidad se ha convertido en el procedimiento quirúrgico de elección para remplazo solo del endotelio corneal dañado

[48]. La queratoprótesis consiste en un dispositivo sintético para restituir la función de la córnea en pacientes con múltiples trasplantes corneales fallidos. Entre sus componentes se encuentra un plato poroso y un anillo de titanio que son asegurados en una córnea donante.

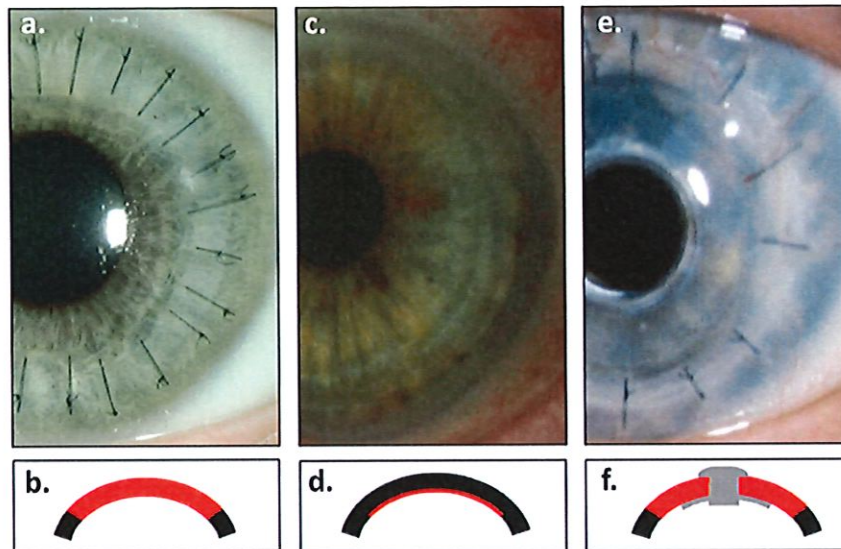


Figura 8. Procedimientos de queratoplastia corneal. (a) Queratoplastia penetrante, (b) para remplazo de todas las capas de la córnea; (c) DMEK, (d) para remplazo solo del endotelio dañado y e) queratoprótesis, f) con fijación de la parte óptica en una córnea donante.

Ciertas complicaciones son exclusivas de cada procedimiento: en la queratoplastia penetrante se presenta dehiscencia de herida, pérdida del humor vítreo, persistencia de defectos epiteliales y úlcera corneal [21]; en la técnica DMEK la pérdida de CEC por sobremanipulación y el desprendimiento del endotelio trasplantado del estroma receptor son complicaciones frecuentes [49] y en el caso de la queratoprótesis la falta de biointegración es siempre un riesgo [50].

A pesar del potencial terapéutico que tienen la queratoplastia penetrante, la técnica DMEK y la queratoprótesis, la mayor limitante de estas estrategias se encuentra en la

escasez de donantes de tejido corneal sano para llevarlas a cabo, en especial en países de América Latina.

1.4 Nuevos abordajes terapéuticos

La ingeniería de tejidos es una opción novedosa y prometedora para solventar la crisis de donantes que se presenta alrededor del mundo. Una de las estrategias utilizada con mayor frecuencia se basa en la construcción de un sustituto del endotelio corneal (SEC) mediante la proliferación *in vitro* de las CEC sobre un soporte celular adecuado.

Para llevar a cabo esta alternativa, tres componentes necesitan ser abordados: las CEC, técnicas de cultivo celular y el uso de soportes celulares.

1.4.1 CEC

Una de las metodologías más comunes para obtención de CEC es el uso de tejido alogénico proveniente de donantes cadavéricos sanos, a partir de los remanentes del endotelio corneal periférico tras la obtención del botón central de la córnea para trasplante. Las CEC tienen la capacidad de responder al estímulo generado por sustancias mitogénicas *in vitro*. Ha sido demostrado que las células de donantes jóvenes (<30 años de edad) tienen una mayor respuesta proliferativa en comparación con donantes mayores (>50 años de edad) [51]. A sí mismo, para la formación de sustitutos endoteliales es necesario contar con una densidad celular óptima (10.000 CEC por mm²), con el fin de obtener una monocapa celular compacta conformada por células de aspecto poligonal similares al endotelio corneal nativo [52].

1.4.2 Técnicas de cultivo celular

La metodología de cultivo celular más común involucra tres aspectos importantes: (i) el aislamiento del endotelio corneal del estroma, (ii) la disociación de las CEC de la MD y (iii) la proliferación *in vitro* de las CEC.

El primer paso de esta técnica consiste en el aislamiento del endotelio a partir del estroma donante [53,54]; una vez que esta membrana es aislada, las CEC son separadas de la MD e individualizadas mediante un tratamiento enzimático con colagenasa [53], tripsina [54] o dispasa [55] para liberar las uniones celulares y permitir de esta manera la división celular. A su vez, se han planteado diferentes alternativas a estos tratamientos enzimáticos con el fin de evitar un posible daño en la superficie celular, siendo la técnica de cultivo por explante adecuada para el cultivo de las CEC [56] (Fig 9).

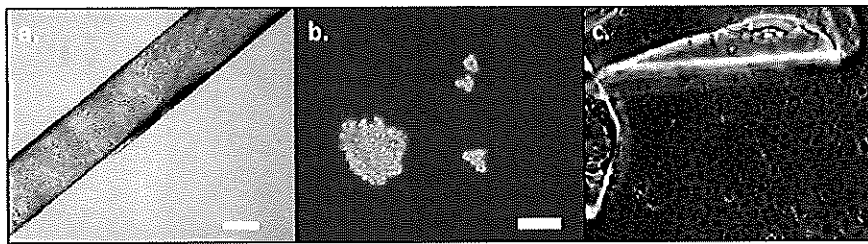


Figura 9. Metodologías para el cultivo de CEC. (a) Aislamiento de la MD con las CEC del estroma donante, (b) cúmulos de CEC después de un tratamiento enzimático con tripsina para disociación de las MD, (c) CEC en cultivo por técnica de explante. Figura adaptada de [57] [56].

Posteriormente, las células son inducidas a salir de la fase G_0 al exponerlas a diferentes combinaciones de factores de crecimiento. El medio de cultivo que ha sido ampliamente utilizado y reportado como óptimo para la proliferación de las CEC, ha sido el OptiMEM-I suplementado con 8% de suero bovino fetal (SBF), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidémico (EGF), 5 ng/mL de factor de crecimiento nervioso (NGF), 20 mg/mL ácido ascórbico, 200 mg/L cloruro de calcio, 100 mg/mL extracto pituitario, 50 mg/mL gentamicina, 1x antibiótico/antimicótico y 0,08% de condroitin sulfato [51][58].

Para establecer la calidad de los cultivos endoteliales bajo sistemas de proliferación es necesario valorar características básicas de las CEC como son: morfología poligonal de las células *in vitro*, así como la expresión de los marcadores ZO-1 [59] y Na^+K^+ /ATPasa [60] (Fig 10). Adicionalmente, otros marcadores presentes en el endotelio corneal como: moléculas de adhesión celular neural (NCAM) relacionadas con una función de barrera [61], la

cadena alfa 2 del colágeno tipo VIII (COL8A2) principal componente de la MD [62], acuaporina 1 (AQP-1) y conexina 43 (Cx43) implicadas en el transporte de líquido en la córnea [63–65], han sido señalados para aumentar la especificidad en la identificación de CEC.

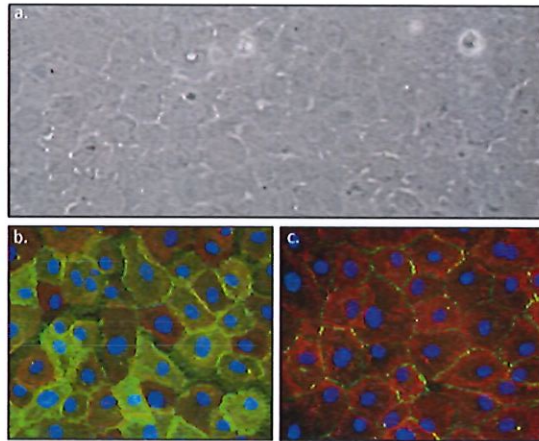


Figura 10. Aspecto de las CEC en cultivo. Analizadas por (a) microscopía de contraste de fase e inmunofluorescencia para (b) $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$ (en verde) y (c) ZO-1 (en rojo). Figura adaptada de [66] y [57] respectivamente.

1.4.3 Soportes celulares

Diversas matrices biológicas han sido utilizadas como soportes celulares con el fin de reproducir la estructura en monocapa del endotelio corneal nativo (Fig 11), tales como: fibroína del gusano de seda [53], MD de origen bovino [54], membranas de colágeno tipo I [9], membrana amniótica [12], estroma descelularizado [67] y cápsula anterior del cristalino (CAC) [55]. Al cultivar las CEC sobre estos soportes forman una monocapa capaz de mantener la expresión de marcadores específicos de endotelio corneal maduro [55,68]. Asimismo, el trasplante de algunos sustitutos en modelos animales de insuficiencia endotelial ha demostrado la restitución de la función endotelial y la transparencia corneal [9,54].

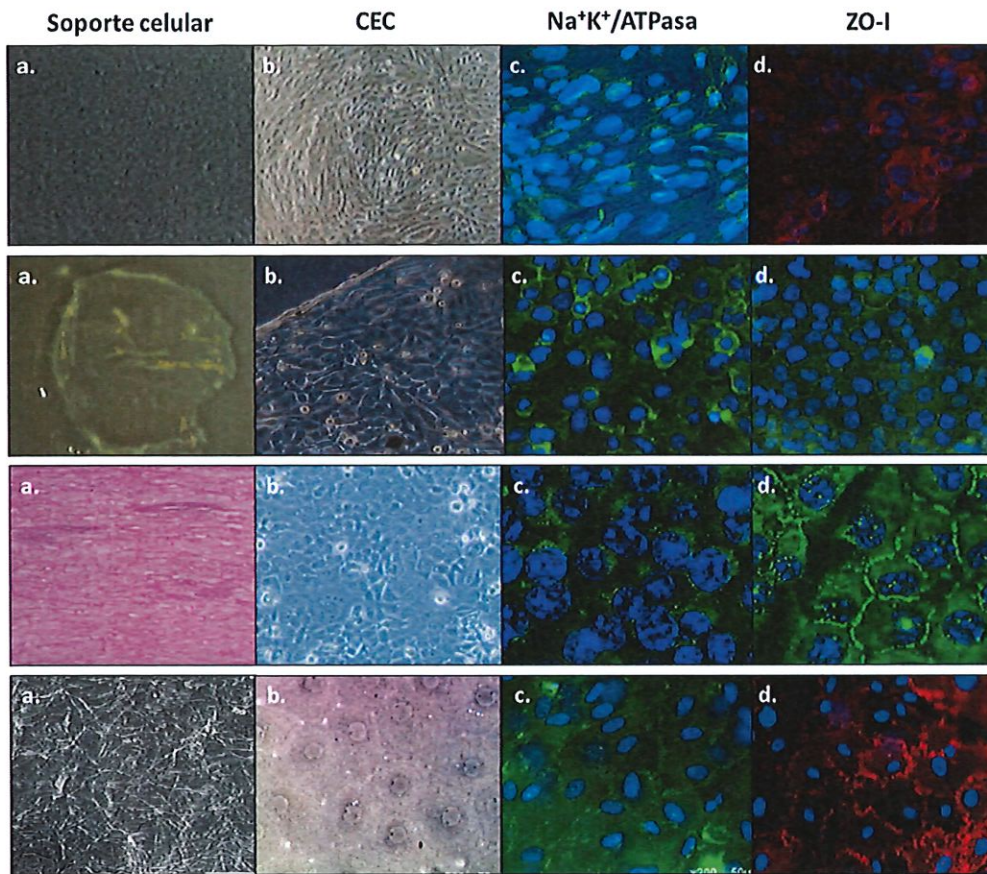


Figura 11. *Sustitutos del endotelio corneal obtenidos por ingeniería de tejidos. Cultivo de CEC sobre un soporte de (a) colágeno recubierto de seda, (b) CAC, (c) estroma descelularizada y (d) colágeno tipo I. Se observa morfología poligonal características de las CEC con marcaje positivo para los marcadores para Na⁺K⁺/ATPasa y ZO-1. Figura adaptada de [53] [55] [68] [69].*

1.4.4 Poblaciones celulares de fuentes extra-oculares

Dado que la cantidad de CEC obtenidas de los remanentes del endotelio corneal periférico pueden no ser suficientes, células de fuentes extra-oculares han sido estudiadas como una alternativa al uso de las CEC para la elaboración de sustitutos del endotelio corneal.

Las células madre son conocidas por su capacidad de auto-renovación y plasticidad para diferenciarse a un tipo celular específico; por lo tanto, han sido consideradas para el tratamiento de enfermedades del endotelio corneal. Ha sido demostrado en un modelo ex

vivo de córneas con lesión endotelial, que las células madre aisladas del cordón umbilical son capaces de adherirse a la MD desnuda y de alterar su morfología con tendencia a formar una monocapa celular empaquetada similar al endotelio corneal [72]. Otra población de células madre considerada como prometedora es la que se encuentra en la pulpa dental, esta estrategia está basada en el principio de que estas células comparten un origen embriológico con los linajes celulares relacionados en la formación del ojo, por lo que sería más fácil su diferenciación a CEC [73].

Otra estrategia, son las células mesoteliales obtenidas del tejido adiposo las cuales han sido propuestas como una alternativa a las CEC. Estas células tienen la capacidad de proliferar formando una monocapa celular que comparte características morfológicas y fenotípicas con las CEC (Figura 27).

La propuesta del uso de células de fuentes extra-oculares es una alternativa a la limitada cantidad de CEC disponibles para la elaboración de un sustituto; sin embargo, es relevante considerar el macro ambiente al que se encontrarían expuestas estas células. La córnea absorbe la radiación ultravioleta en la longitud de onda de los 295 nm y junto con el cristalino permite que solo el 1% de esta energía alcance la retina [70]. Por lo tanto, cualquier tipo celular diferente de las CEC que sea propuesto para elaboración de un sustituto del endotelio corneal deberá de contar con los mecanismos antioxidantes de los tejidos oculares (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, ácido ascórbico y glutatión) que las protegen de daño en el ADN, evitando así el desarrollo de malignidades [71].

A pesar de que la ingeniería de tejidos es una opción prometedora para solventar la escasez de donantes, algunos de los componentes esenciales para la proliferación *in vitro* de las CEC son de origen animal; es el caso en particular del suero bovino fetal (SBF), el cual se ha enfrentado durante años a serios cuestionamientos éticos y científicos [13]. Además, el auge de la medicina regenerativa ha obligado a que las entidades regulatorias de diferentes países exijan que los productos de terapia celular destinadas a uso clínico se adhieran a las guías de las Buenas Prácticas de Manufactura, limitando el uso de

componentes xenogénicos durante el proceso de aislamiento, expansión y obtención del producto final.

Por lo tanto, la obtención de una monocapa celular: i) con morfología similar a las CEC, ii) que exprese de manera natural marcadores específicos del endotelio corneal nativo, iii) sin necesidad de las estrategias de cultivo celular abrirían la posibilidad de contar con un nuevo abordaje terapéutico para los pacientes que están en la larga lista de espera por un trasplante corneal.

2

Características epidemiológicas de los donantes de tejidos oculares y estudio morfológico de las células del ECAC y CEC

2.1 Introducción

A la fecha, el desarrollo de sustitutos del endotelio corneal se ha planteado únicamente mediante estrategias de ingeniería de tejidos, para ello es necesario un conocimiento profundo a cerca de las interacciones de las CEC con la matriz extracelular propuesta como soporte, la cual es crucial para el óptimo mantenimiento de la morfología celular. Independiente del tipo de soporte elegido, el sustituto obtenido debe imitar la estructura del endotelio corneal nativo [72].

Uno de los grandes inconvenientes de las estrategias basadas en la expansión *in vitro* de las CEC, es la pérdida de la morfología característica en panal de abeja con tendencia a la transformación fibroblástica (Fig 12). Este cambio en la citoarquitectura conlleva a la: i) disrupción de la monocapa celular, ii) pérdida de la inhibición por contacto célula-célula, iii) cambios en la matriz extracelular y por tanto iv) afectación de la función de bomba y barrera. A pesar de que han sido planteadas estrategias para evitar la transformación fibroblástica de las CEC, como el uso de un sistema de cultivo compuesto por: (i) fase de proliferación para incrementar la densidad celular de las CEC, y (ii) fase de estabilización para mejorar la morfología celular [73], la pérdida de su citoarquitectura es siempre un riesgo.

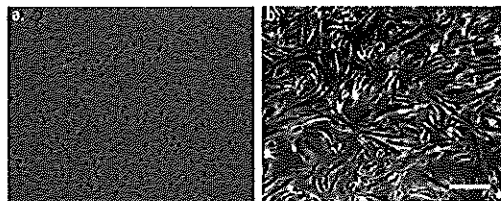


Figura 12. Aspecto morfológico de monocapas celulares formadas por diferentes fenotipos de las CEC. (a) Aspecto poligonal normal y (b) aspecto fibroblástico. Figura adaptada de [74].

En este contexto, un sustituto idóneo obtenido sin la necesidad de las estrategias de cultivo celular deberá compartir características importantes con el endotelio corneal como son: i) disponer de una estructura en monocapa con células de aspecto poligonal y ii)

conservar una membrana basal similar a la MD. De manera ideal, el sustituto podría: iii) conservar una relación embriológica y anatómica con el endotelio corneal, y estar iv) adaptado a las condiciones del medio intra-ocular. Hasta el momento no se ha considerado la posibilidad de un sustituto del endotelio corneal, no obstante, el ECAC cuenta con características que en teoría le permitirían ser un candidato potencial para estos fines. El hecho de que el ECAC pueda ser recuperado de un tejido considerado de desecho tras la procuración de la córnea para donación, y a partir de un donante cadavérico seleccionado en base a su historia clínica, controles serológicos y buen estado del tejido ocular por un Banco de Tejidos ofrece la posibilidad de obtener un tejido sano con controles biológicos.

2.1.1 Aspectos embriológicos y anatómicos de las células del ECAC y de las CEC

Desde el punto de vista embriológico, el ECAC comparte características germinales con el endotelio corneal. Las células que dan origen al epitelio y al endotelio se encuentran en una región del ectodermo conocida como borde de la placa neural (PN), donde se encuentran los precursores de ambos: el ectodermo pre-placoda (EPP) y las células de la cresta neural (CN), respectivamente [75].

El EPP eventualmente se separa en regiones donde el ectodermo superficial sufre un engrosamiento inducido por la vesícula óptica (VO) para la formación de la placoda (PC) que posteriormente dará origen a la vesícula del cristalino (VC), de la cual se forma el ECAC en su polo anterior y va desapareciendo en la región ecuatorial por elongación de las células para formar las fibras del cristalino (FC) [75,76]. Las células de la CN (CCN) son identificadas como un engrosamiento de la superficie del ectodermo. Estas células experimentan una migración sobre la superficie que corresponderá al estroma maduro para formar una monocapa celular que dará origen al endotelio corneal [77]. Ha sido demostrado que la migración de las CCN no puede ocurrir a menos que el cristalino se encuentre presente [78], lo que indica que las señales generadas por el ECAC permiten la migración de las células que dan origen al endotelio [79] (Fig 13).

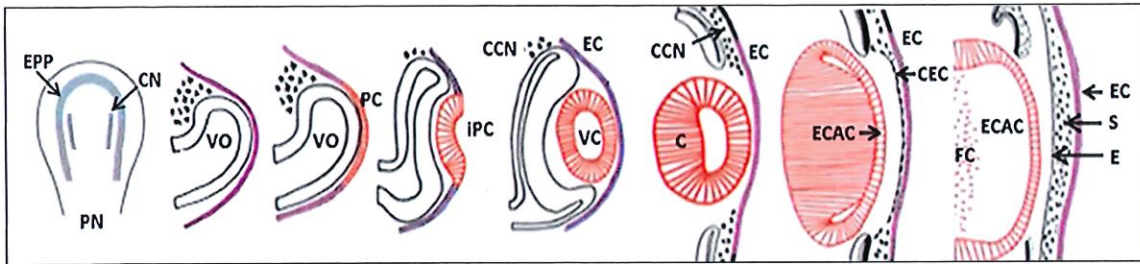


Figura 13. Desarrollo embriológico del ojo desde la PN hasta la formación del cristalino y la córnea. Abreviaturas: PN, placa neural; EPP, ectodermo pre-placoda; CN, cresta neural; VO, vesícula óptica; PC, placoda del cristalino; IPC, invaginación de la placoda del cristalino; CCN, células de la cresta neural; VC, vesícula del cristalino; EC, epitelio corneal; C, cuerpo del cristalino; ECAC, epitelio de la cápsula anterior del cristalino; CEC, células del endotelio corneal; FC, fibras del cristalino; S, estroma y E, endotelio corneal. Figura adaptada de [75,76].

Anatómicamente, el cristalino y la córnea representan las estructuras refractivas más importantes del segmento anterior del ojo (Fig 14). En un adulto el ECAC cubre el polo anterior del cristalino como una monocapa [80] con una densidad celular normal de 4,307 células/mm² en la región central [81]. En contraste, el endotelio corneal se encuentra localizado en la parte posterior de la córnea donde forman una monocapa altamente organizada con una densidad celular de 3,400 células/mm² [4]; ambas monocapas tienen una morfología característica poligonal sobre sus membranas basales, la CAC y la MD respectivamente [4,80].



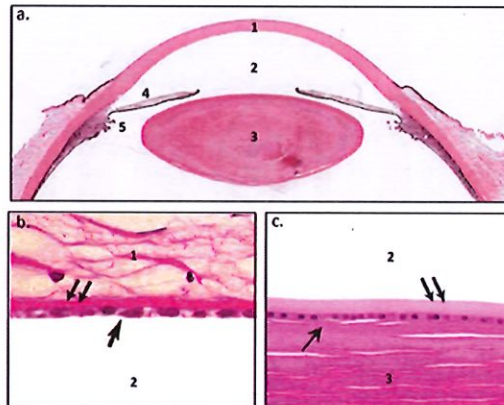


Figura 14. Estructuras del segmento anterior del ojo. (a) Aspecto microscópico del segmento anterior mediante tinción con H&E, se observa: (1) córnea, (2) cámara anterior, (3) cristalino, (4) iris y (5) musculo ciliar. (b) CEC (flecha) adheridas a la superficie posterior del (1) estroma corneal por la (dos flechas) MD, y bañadas por el humor acuoso en la (2) cámara anterior del ojo, tinción con H&E, magnificación 132x; (c) ECAC (flecha) sobre la (dos flechas) CAC, la cual se encuentra bañada por el humor acuoso de la (2) cámara anterior del ojo, mientras que las células se encuentran en contacto directo con las fibras del (3) cuerpo del cristalino; tinción con H&E, magnificación 132x. Abreviaturas: **ECAC**, epitelio de la cápsula anterior del cristalino; **CAC**, cápsula anterior del cristalino; **CEC**, células endoteliales corneales. Figura adaptada de [20].

2.1.2 Estructura y organización de las células del ECAC y de las CEC

Las células del ECAC interactúan entre ellas para formar una estructura tridimensional altamente polarizada; su extremo apical es de aspecto poligonal, mientras que su polo basal de características irregulares se encuentra en contacto íntimo con la CAC [82,83]. Esta conformación polarizada ha sido también descrita en las CEC, en las que la superficie celular apical es de características poligonales y las membranas basolaterales presentan múltiples pliegues de aspecto irregular adheridos a la MD [72] (Fig 15).

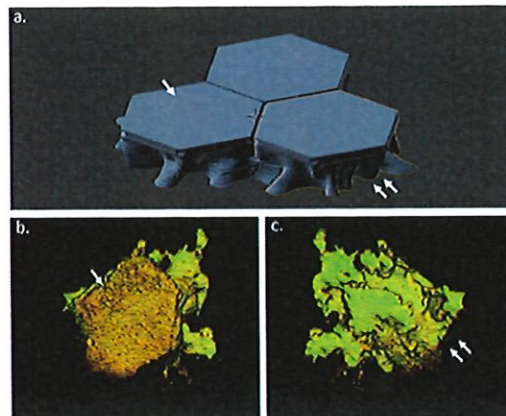


Figura 15. Estructura tridimensional de las CEC y de las células del ECAC. (a) Reconstrucción de las CEC en confluencia y (b-c) imágenes de una célula aislada del ECAC mediante microscopía confocal. En ambos tipos celulares se observa un aspecto hexagonal en la superficie (flecha) apical e irregular de la región (doble flecha) basal. Abreviaturas: **ECAC**, epitelio de la cápsula anterior del cristalino; **CEC**, células endoteliales corneales. Figura adaptada de [72] y [83].

2.1.3 Membranas basales de las células del ECAC y de las CEC

La CAC es la membrana basal del ECAC, con un espesor de 25-35 μm en el polo anterior del cristalino [84]. Su mayor componente es colágeno tipo IV [85] que interactúa con colágeno tipo XV, XVIII, perlecan y laminina para formar una estructura tridimensional [84]. En contraste, la MD tiene un espesor de 5-10 μm [86] y se encuentra organizada como un arreglo de nodos compuestos de colágeno tipo VIII [24,25]; aunque en su composición también incluye colágeno tipo IV, el cual se encuentra relacionado con la adhesión de la MD al estroma posterior [87]. Se ha descrito que en ambas membranas basales se incrementa su espesor por cambios relacionados a la edad [88,89].

Ambas matrices extracelulares no solo proveen un soporte sólido para las células, sino que también actúan como reservorio de factores de crecimiento, como ocurre con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), el cual se encuentra secuestrado mediante su unión al heparan sulfato que forma parte de la composición de

estas membranas [84,90]. Desde un aspecto mecánico, la CAC y la MD también tienen propiedades similares, sin embargo la MD es más rígida en comparación con la CAC [91].

2.1.4 Ambiente intra-ocular de las células del ECAC y de las CEC

En el segmento anterior del ojo, el ECAC y las CEC se encuentran separadas por el humor acuoso de la cámara anterior, el ambiente creado por la composición especial de este líquido es crítica para el mantenimiento de las características quiescentes de las células del ECAC [92] y de las CEC [93].

En la región ecuatorial del cristalino se encuentra una zona especial del epitelio, conocida como zona germinal (ZG) [94], caracterizada por la presencia de células progenitoras que dan origen a las FC [95], (Fig 16). Este fenómeno es exclusivo de esta zona donde su población celular entra en contacto con el humor vítreo [92].

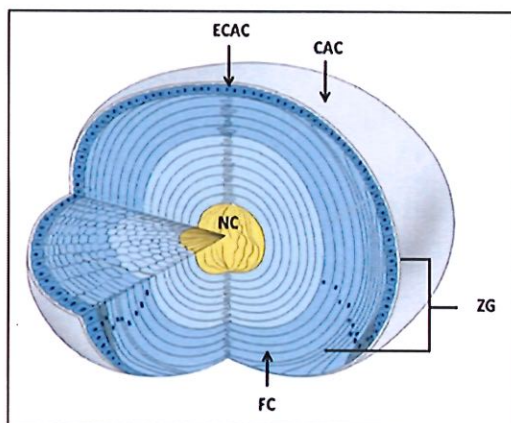


Figura 16. Citoarquitectura del cristalino. La CAC envuelve el cristalino en su superficie interna, hacia el polo anterior se encuentra el ECAC. En la región ecuatorial se encuentra la ZG que da origen a las FC que envuelven completamente el núcleo del cristalino (NC). Abreviaturas: **ECAC**, epitelio de la cápsula anterior del cristalino; **CAC**, cápsula anterior del cristalino; **ZG**, zona germinativa; **FC**, fibras del cristalino y **NC**, núcleo del cristalino.

El cristalino y la córnea son los únicos tejidos transparentes en el cuerpo y están adaptados para la absorción de la luz por el ojo. El cristalino absorbe la radiación

ultravioleta entre 295 a 395 nm, mientras que la córnea absorbe la radiación ultravioleta por debajo de los 295 nm [96] (Fig 17), estos filtros intraoculares permiten que solo el 1% o menos de esta energía luminosa alcance la retina [70].

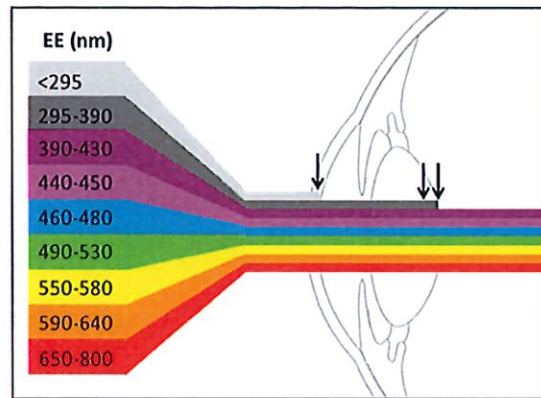


Figura 17. Absorción del espectro electromagnético por la córnea y el cristalino. La córnea absorbe radiaciones por debajo de los (flecha) 295 nm, mientras que el cristalino absorbe en las longitudes de onda entre (dos flechas) 295-390 nm. Ambas estructuras permiten el paso del espectro de la luz visible hasta la retina.

La exposición excesiva a la radiación ultravioleta se encuentra asociada con el desarrollo de patologías en el cristalino [97] y en el endotelio corneal [98], que pueden comprometer la transparencia de estas estructuras. Por lo tanto, para la protección de este estímulo luminoso, el ECAC y las CEC disponen de mecanismos antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), que evitan el desarrollo de alteraciones en el ADN de estas células [71]. Es de resaltar, que a pesar de la exposición continua a la luz ultravioleta, no existen casos reportados de malignidad en el cristalino [99].

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Donantes

Los tejidos oculares se obtuvieron de donantes de órganos cadavéricos reportados al Banco Multitejidos y Centro de Terapias Avanzadas de la Clínica FOSCAL Internacional, entre el periodo de enero a junio de 2019. Las características epidemiológicas de los

donantes como: i) edad, ii) género, iii) causa de muerte, iv) lugar y v) tiempo de captación de los donantes, se obtuvieron de la base de datos del registro de donantes de dicha institución.

Posterior a la extracción del tejido corneal de los donantes cadavéricos, se realizó un examen oftalmológico de rutina del tejido preservado en Eusol (Alchimia, Italia) mediante lámpara de hendidura (Haag-Streit, Suiza), en el que se evaluaron las siguientes características del tejido: presencia o ausencia de i) claridad corneal, ii) ictericia corneal, iii) pterigión, iv) arco senil, v) infiltrados en limbo o estroma, vi) opacidades, vii) cuerpo extraño, viii) signos de ectasia y ix) evidencia de cirugía refractiva; x) porcentaje de defecto epitelial; ausencia o presencia (leve, moderada, severa) de xi) pliegues en la MD, xii) pliegues estromales, así como xiii) guttas centrales, xiv) guttas periféricas y xv) opacidad estromal.

A la exploración mediante microscopía especular (KONAN, Japón), se evaluaron las siguientes características: i) espesor corneal (μm), ii) densidad endotelial (CEC/ mm^2), iii) tamaño de las CEC (μm^2) y ausencia o presencia de iv) pleomorfismo y/o v) polimegatismo.

2.2.2 Muestras

Las muestras (cristalino y endotelio corneal) se obtuvieron a partir de tejidos oculares considerados de desecho luego de la procuración y trepanación de la córnea para trasplante. El tejido humano fue manejado de acuerdo a la declaración de Helsinki, con aprobación del Comité de ética de la Clínica FOSCAL Internacional (Acta No. 16) y previa firma de consentimiento informado para uso del tejido con fines de investigación.

2.2.3 Procesamiento de las muestras

El cristalino fue obtenido mediante el corte de las fibras de la región zonular utilizando tijeras y pinzas de microdissección (Rumex, EUA). La CAC con su epitelio íntegro se aisló cuidadosamente del cuerpo del cristalino después de una capsulorrexia en 360°;

posteriormente se lavó con solución salina balanceada (BSS, por sus siglas en inglés) (Alcon, Chile) y se colocó en una caja de petri para su análisis morfológico.

Al endotelio corneal se le realizó una tinción de vitalidad con azul de tripano (ThermoFisher, EUA) durante 60 segundos para verificar la viabilidad de las CEC sobre la MD aún adherida al estroma corneal, y se realizó lavado con BSS. Bajo microscopio estereoscópico (Leica, Germany), con pinzas de micro-disección (Rumex, EUA) se realizó aislamiento del endotelio corneal siguiendo la línea de Schwalbe como referencia y se separó cuidadosamente del estroma corneal subyacente. Luego de su aislamiento el endotelio corneal se lavó con BSS y se colocó en una caja de petri para análisis morfológico.

2.2.4 Análisis morfológico de las células del ECAC y de las CEC

2.2.4.1 Microscopía de contraste de fases

La morfología de las células del ECAC adheridas a la CAC y de las CEC adheridas a la superficie de la MD se evaluó en fresco bajo un microscopio de contraste de fase (Leica, Germany). Inmediatamente después de su aislamiento cada monocapa celular se colocó en una caja de petri con BSS para su análisis y registro fotográfico utilizando una cámara EC3 (Leica, Germany) adaptada al microscopio.

2.2.4.2 Microscopía electrónica

La morfología de la superficie de las células del ECAC y de las CEC con sus respectivas membranas basales se examinó mediante microscopía electrónica. Las CEC sobre la MD y las células del ECAC sobre CAC posterior a su aislamiento se fijaron con metanol (marca, país) a 4°C durante 10 minutos y se lavaron con un buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). A continuación, los tejidos se deshidrataron a través de distintas concentraciones de acetona (30, 50, 70, 90 y 100%) durante 10 minutos respectivamente y se secaron por método de punto crítico, las muestras se recubrieron con oro bajo un

sistema vacuum antes de su análisis con microscopio JEOL 6610LV (JEOL co., Tokyo, Japan) a 20 kV de voltaje acelerado.

2.2.5 Análisis estadístico

El programa Stat Graph Prism 5.0 fue usado para el análisis estadístico. Todos los valores fueron expresados como la media \pm SD. La diferencia entre las medias fue establecida por la prueba de ANOVA unifactorial. Cuando la prueba de ANOVA mostró una diferencia estadísticamente significativa, la comparación entre medias se analizó mediante una prueba de Tukey's. La significancia fue considerada $p < 0.05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Características demográficas de los donantes

Se evaluaron 58 donantes oculares, de los cuales predominó el género masculino con un 60% del total, respecto al género femenino un 40% (Fig 18).

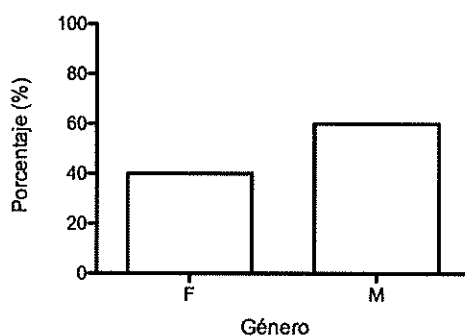


Figura 18. Distribución de los donantes en función del género. Porcentaje de donantes femeninos (F) y masculinos (M).

El rango de edad del grupo de estudio se encontró entre los 16 y 72 años, con una media de 40.75 ± 16.64 ; el rango de edad más frecuente estuvo entre los 19-37 años de edad con un 43%, seguido de los siguientes rangos en orden descendente: 36-56 años (28%), 57-76 (23%), y el menos frecuente de los 0-18 años con un 6% (Fig 19).

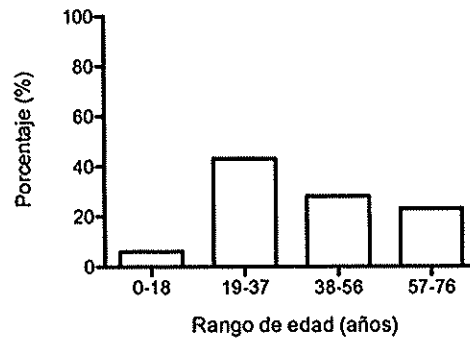


Figura 19. Distribución de los donantes en función del rango de edad. Porcentaje de donantes en los siguientes grupos de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.

Del total de donantes masculinos el rango de edad que predominó fue entre 19-37 años (31%), mientras que del género femenino fue del 38-56 años (14%) (Fig 20).

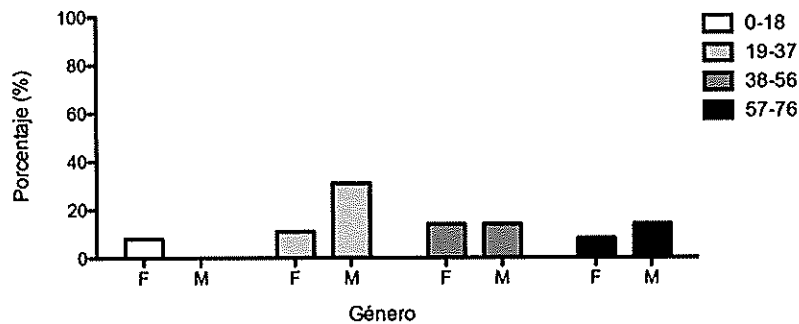


Figura 20. Distribución de los donantes en función del género y rango de edad. Porcentaje de donantes de acuerdo a su género en los siguientes grupos de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.

Las causas de muerte reportada por orden de frecuencia fueron: i) enfermedad cerebrovascular (34%), ii) evento violento (23%), iii) cáncer (17%), iv) accidente automovilístico (14%) y v) enfermedad cardiovascular (12%) (Fig 21).

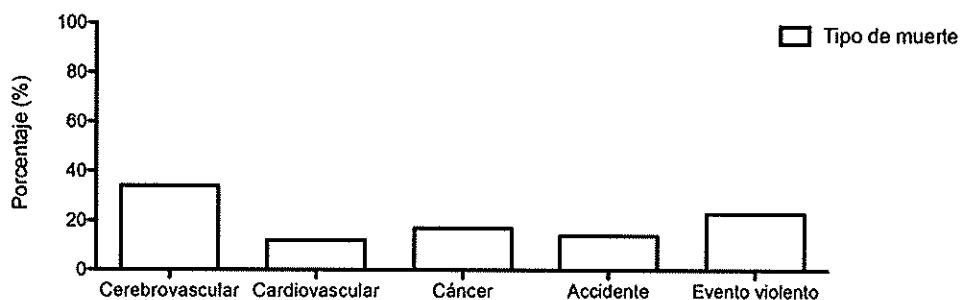


Figura 21. Distribución de los donantes en función del tipo de muerte. Porcentaje de donantes de acuerdo con la causa de muerte: enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, cáncer, accidente y evento violento.

Se determinó que la causa de fallecimiento más frecuente en el género masculino fueron las enfermedades cerebrovasculares (20%), evento violento (15%) y accidente (14%), mientras que en el género femenino los eventos más frecuentes asociados a la defunción fueron cáncer y enfermedad cardiovascular en ambos casos un 14% (Fig 22).

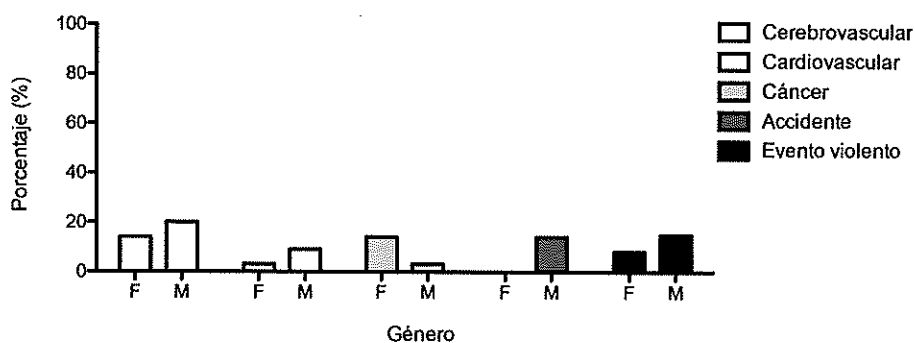


Figura 22. Distribución de los donantes en función del género y el tipo de muerte. Porcentaje de donantes de acuerdo con la causa de muerte y su género: enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, cáncer, accidente y evento violento.

Las alertas generadas para la obtención de los tejidos con fines de trasplante provenientes de los centros sanitarios tuvieron una media en tiempo de captación de tejido de 3-5 hrs (Fig 23).

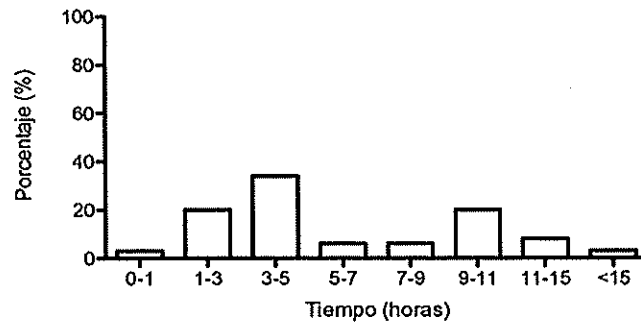


Figura 23. Porcentaje de donantes en función del tiempo (horas) de captación del tejido.

2.3.2 Características del tejido donado mediante exploración por lampara de hendidura

Se realizó una evaluación de las características del tejido en cuanto a: i) claridad corneal, en donde la calidad de las muestras fue buena en el 95% de los casos, regular en un 2% y mala en un 3% (Figura 24); ausencia de: ii) ictericia escleral, se observó en el 100% de los casos; iii) pterigión, en el 93%; iv) arco senil, en el 74%, v) infiltrados en limbo o estroma en el 98% de (Figura 25); vi) opacidades, en el 100%; vii) cuerpos extraños, en el 100%; viii) signos de ectasia, en el 100% y ix) evidencia de cirugía refractiva en el 100% de las muestras (Fig 26).

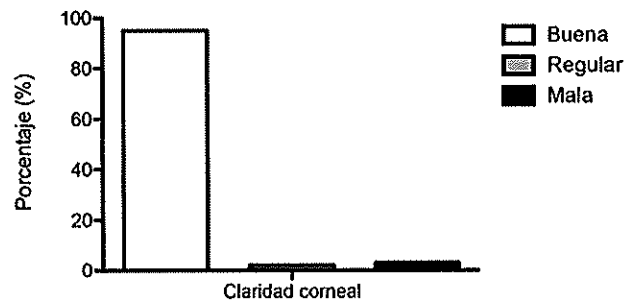


Figura 24. Distribución de los donantes en función de la claridad corneal del tejido. Porcentaje de donantes de acuerdo con la calidad de la claridad corneal: buena, regular y mala.

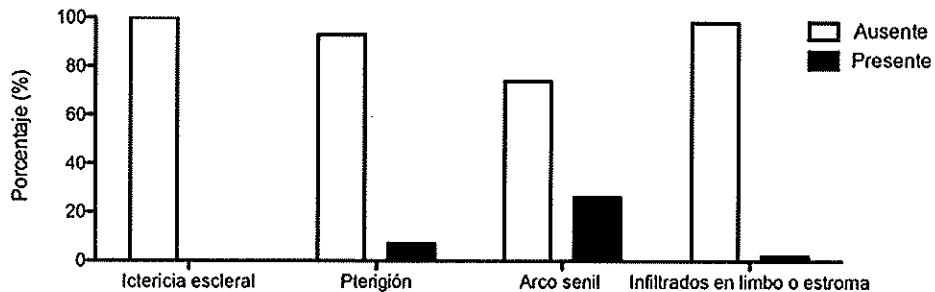


Figura 25. Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia de: ictericia escleral, pterigion, arco senil e infiltrados en limbo o estroma.

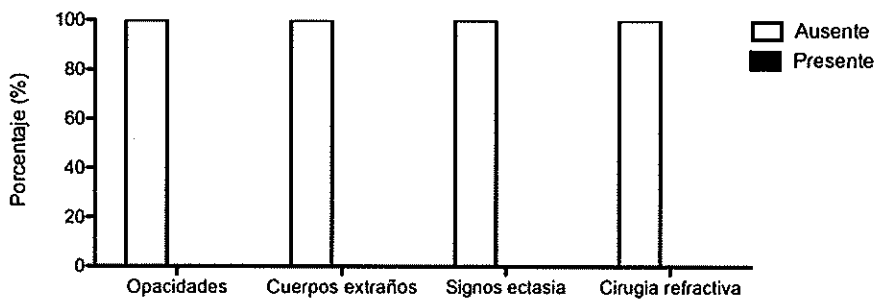


Figura 26. Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia de: opacidades, cuerpos extraños, signos de ectasia y evidencia de cirugía refractiva.

En los tejidos se realizó una evaluación del defecto epitelial, donde se determinó que el 53% de las muestras no presentaron defectos epiteliales, mientras que en un 29% se observaron defectos entre el 1-20%; un 9% con defectos entre el 21-40%, y el 9% restante presentaron un defecto entre el 41-60%, es de mencionar que no se detectaron muestras con alteraciones entre el 61-100% (Fig 27).

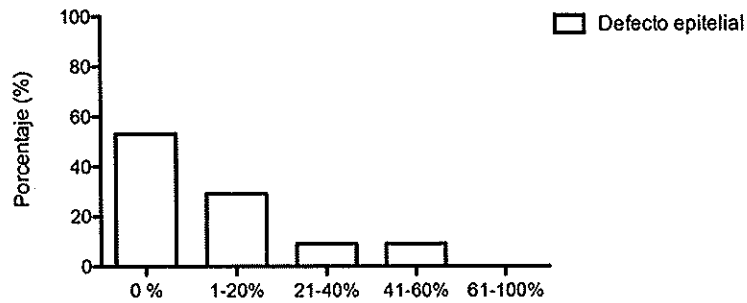


Figura 27. Distribución de los donantes en función de la presencia del defecto epitelial entre: 0; 1-20; 21-40; 41-60 y 61-100%.

Al realizar la evaluación de los pliegues en la MD, se determinó que un 17% de las muestras carecían de ellos, mientras que en el 83% se presentó esta característica, de los cuales el 71% fueron leves, un 7% moderado y un 5% severo. En cuanto a los pliegues estromales fueron ausentes en el 97% de las muestras y severos en un 3%. A su vez, las guttas centrales fueron ausentes en un 89% de las muestras, mientras que un 8% presentaron un estadio leve y un 3% moderado; y las guttas periféricas fueron ausentes en un 93% de las muestras, mientras que un 2% presentó estadio leve, 2% moderado y 3% severo. La opacidad corneal fue ausente en un 97% y 3% en estadio leve (Fig 28).

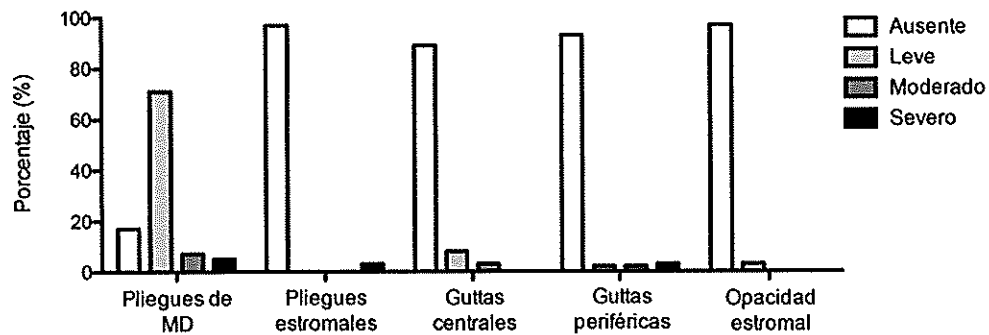


Figura 28. Distribución de los donantes en función de la ausencia o presencia (leve, moderada o severa) de: pliegues de MD, pliegues estromales, guttas centrales, guttas periféricas y opacidad estromal.

2.3.3. Características del tejido donado mediante exploración por microscopia especular.

Al evaluar el espesor corneal en los tejidos de los donantes, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias en los distintos grupos de edad (años): 0-18 ($571.5 \mu\text{m} \pm 7.77$); 19-37 ($549.1 \mu\text{m} \pm 25.84$); 38-56 ($564.8 \mu\text{m} \pm 38.19$) y 57-76 ($548.6 \mu\text{m} \pm 26$) (Fig 29).

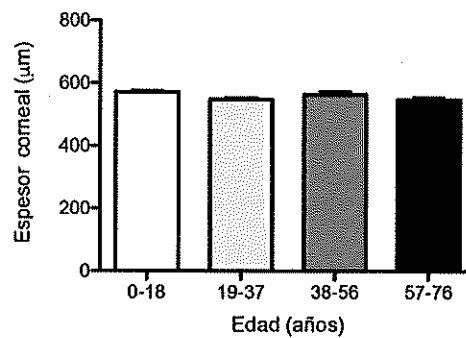


Figura 29. Espesor corneal (μm) en función del rango de edad de los donantes: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años.

En la evaluación de la densidad celular de las CEC por grupo de edad (años), se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del grupo de 19-37 ($3076 \pm 359.6 \text{ CEC}/\text{mm}^2$) versus los grupos de 38-56 ($2583 \pm 363.3 \text{ CEC}/\text{mm}^2$) y 57-76 años ($2766 \pm 320.5 \text{ CEC}/\text{mm}^2$) (Fig 30).

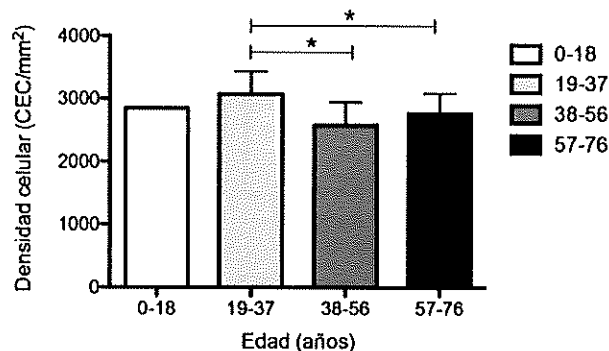


Figura 30. Densidad celular endotelial (CEC/mm^2) en función del rango de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años. Se utilizó análisis de variación (ANOVA), * indica una diferencia significativa $p < 0.05$. Datos de $n=58$ sujetos.

Al determinar el tamaño de las CEC por grupo de edad (años) se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de 19-37 ($328.5 \pm 36.49 \mu\text{m}^2$) y el grupo 38-56 años ($394.6 \pm 58.30 \mu\text{m}^2$) (Fig 31).

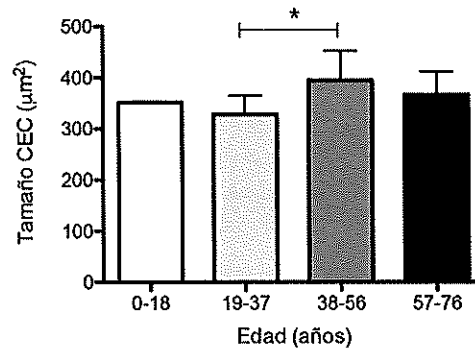


Figura 31. Tamaño de las CEC (μm^2) en función del rango de edad: 0-18; 19-37; 38-56 y 57-76 años. Se utilizó análisis de variación (ANOVA), * indica una diferencia significativa $p < 0.05$. Datos de $n=58$ sujetos.

Al analizar las características de pleomorfismo y polimegatismo en las CEC se determinó su ausencia en el 78 y 75% de las muestras respectivamente (Fig 32).

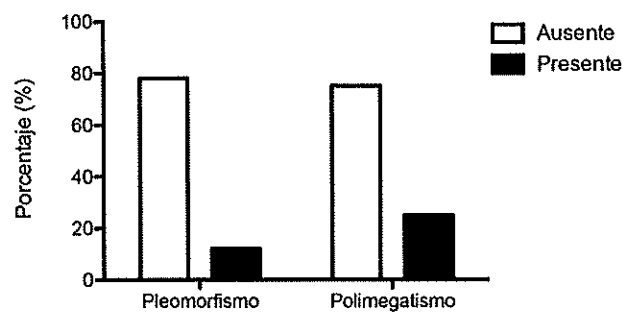


Figura 32. Porcentaje de donantes en función de la presencia o ausencia de: pleomorfismo y polimegatismo.

Se determinó que del total de donantes (79%) el tamaño más frecuente de las CEC fue de $300-399 \mu\text{m}^2$ con densidades celulares entre 2400-3400 células por mm^2 (Fig 33).

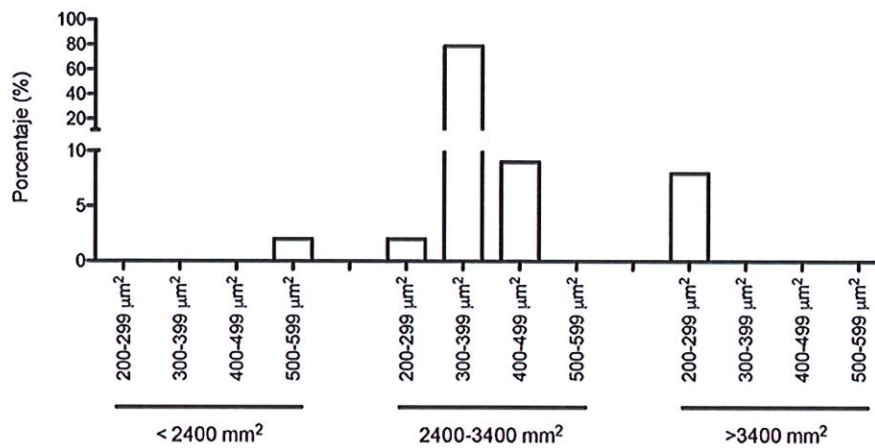


Figura 33. Porcentaje de donantes en función de: i) tamaño, 200-299; 300-399; 400-499 y 500-599 μm^2 y ii) densidad celular, <2400; 2400-3400 y >3400 CEC/mm².

2.3.4 Características morfológicas del ECAC sobre CAC y de las CEC sobre la MD mediante microscopía de contraste de fase.

Al evaluar las características morfológicas del ECAC posterior a su aislamiento, se observó la presencia de una monocapa de células adheridas a la CAC formada por células pequeñas, compactas, de aspecto poligonal y con una relación núcleo-citoplasma 1:2 (Fig 34), de acuerdo a la clasificación de Zhang y colaboradores [100].

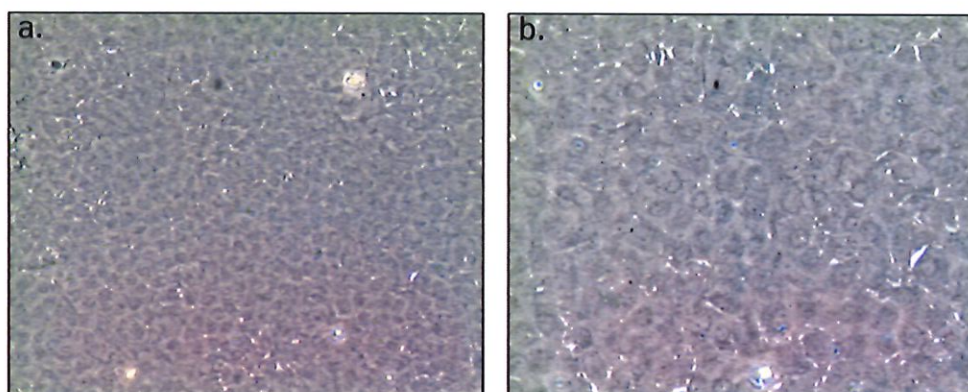


Figura 34. Microscopía de contraste de fase del ECAC humana sobre la CAC, magnificación (a) 10x, y (b) 20x.

De manera similar, las CEC aparecen adheridas a la MD formando una monocapa celular compacta con un patrón de empedrado poligonal homogéneo, y también presentan una relación núcleo-citoplasma 1:2 (Fig 35), [100].

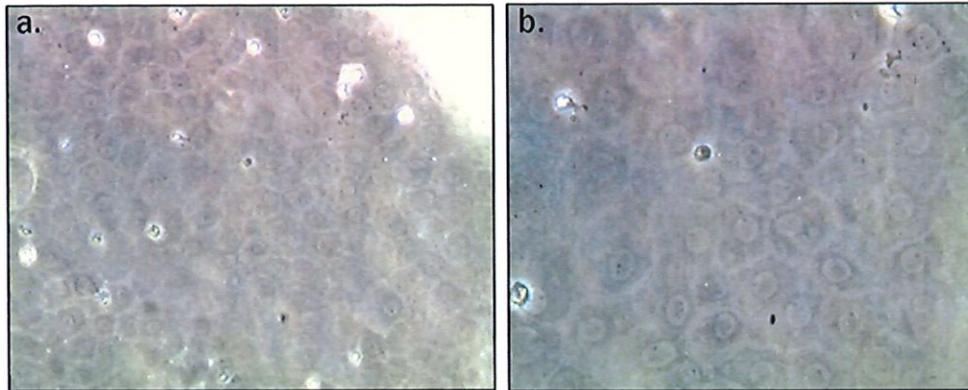


Figura 35. Microscopia de contraste de fase de las CEC humana sobre la MD, magnificación (a) 10x, y (b) 20x.

Es de notar que el ECAC aparece como una monocapa con mayor densidad celular a expensas de células más pequeñas que el endotelio corneal. Cabe resaltar que después de su aislamiento tanto el ECAC como el endotelio corneal presentan una tendencia natural a enrollarse sobre si mismos.

2.3.5 Características morfológicas del ECAC sobre la CAC y de las CEC sobre la MD mediante microscopía electrónica.

El análisis microscópico determinó que las células del ECAC adheridas a la CAC aparecen como una monocapa celular confluyente formada por células pequeñas de aspecto poligonal. A su vez, el análisis de la superficie de la CAC en el lado de adhesión del ECAC muestra un aspecto homogéneo (Fig 36).

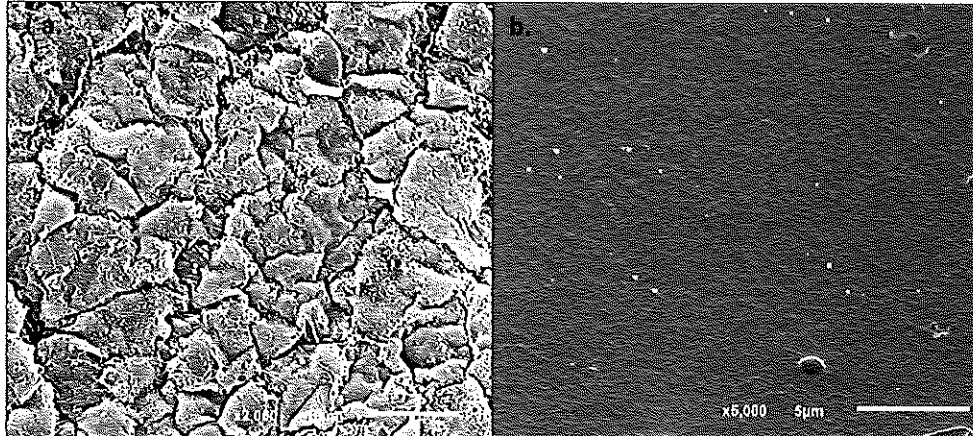


Figura 36. Microscopia electrónica del (a) ECAC humana sobre la CAC, barra de escala 10 µm, y (b) CAC por la cara donde se encuentran las células del ECC, barra de escala 5 µm.

En contraste, las CEC sobre la MD lucen como una monocapa celular compacta, con células de aspecto más grande en comparación con el ECAC. El análisis de la superficie de la MD reveló un aspecto más irregular en comparación con la CAC (Fig 37).

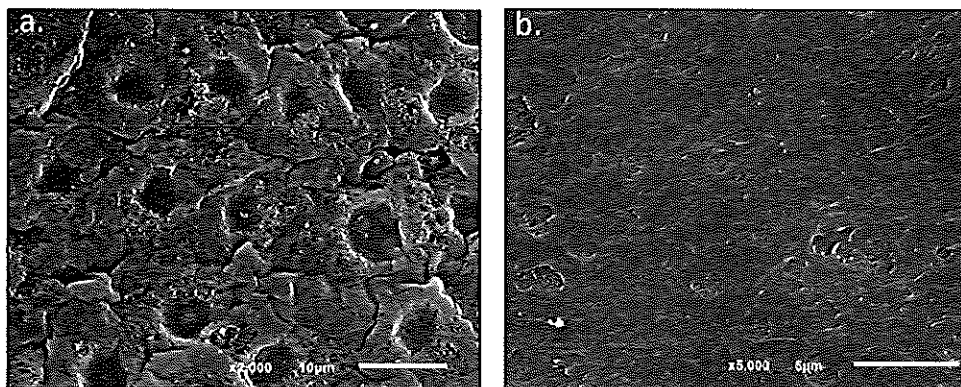


Figura 37. Microscopia electrónica de las (a) CEC humana sobre la MD, barra de escala 10 µm, y (b) MD por la cara donde se encuentran as CEC, barra de escala 5 µm.

2.4 Discusión

En los bancos de tejidos la adecuada selección de los donante es uno de los requisitos primordiales para garantizar la calidad de los tejidos a implantar. En la actualidad, el protocolo de selección de donantes de tejido ocular incluye la evaluación del tejido corneal mediante lámpara de hendidura, microscopía especular y paquimetría. Aunque el aspecto morfológico y la densidad de las CEC son considerados como los criterios más importante en la evaluación del tejido destinado a donación; de acuerdo a la Asociación Americana de Bancos de Ojo (EBAA), se debe incluir también la evaluación del perfil epidemiológico del donante como parte del protocolo de selección [101].

A la fecha, uno de los estudios más grandes de donantes de córnea fue realizado por Sugar y colaboradores, quienes reportaron los resultados de 1,090 casos. En este estudio se evaluó el impacto de factores demográficos y propios del tejido donado en la sobrevivida tras el trasplante. Se encontró que no existe un límite en la edad para la donación, ya que no hay una relación directa entre la calidad del tejido y la edad del donante. Se describe además, que características del donante como: i) género, ii) causa de muerte (enfermedad cardiovascular, cáncer, trauma, enfermedad respiratoria y otras), iii) el tiempo entre la muerte y la preservación del tejido (de 0 a 10 hrs); así como características propias del tejido corneal: densidad endotelial ($2300 > 3000$ células/mm²), polimegatismo y/o pleomorfismo (ligero-moderado), guttas (no verdaderas); así como, defectos epiteliales (menores del 50%), opacidad epitelial (hasta moderada), edema estromal (ligero), presencia de arco senil, y pliegues en la MD (escasos) no son variables que influyen en la sobrevivida del tejido corneal trasplantado [102] [103]. Sin embargo, es importante resaltar que el autor no incluyó en este estudio situaciones extremas como tiempo de muerte prolongada, así como alteraciones severas en el epitelio, estroma o endotelio. Las características de los tejidos de nuestros donantes se encontraron dentro de los parámetros normales que indican que el tejido corneal se encuentra en condiciones óptimas para ser trasplantado, de manera semejante a los resultados del estudio de Sugar.

Se ha descrito que una densidad celular entre 2300-3300 CEC/mm² se considera un parámetro de buena calidad del tejido corneal destinado a trasplante [102], en nuestro estudio el 100% de las muestras se encontraron dentro de ese rango de densidad celular.

En lo relacionado a la causa de muerte, se ha reportado que las enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de fallecimiento [104], de manera semejante a lo observado en nuestro estudio. No obstante, la muerte por eventos violentos correspondió a la segunda causa de muerte; a pesar de que los índices de fallecimiento por causa violenta en Colombia han disminuido desde 1996, sigue siendo uno de los países con mayor tasa de muertes por esta causa en América Latina [105]. En nuestro estudio las muertes por accidente representaron la tercer causa en frecuencia; lo que se relaciona con las estadísticas del Banco Mundial, que reportan que América Latina es la región que tiene el mayor índice de muertes por accidente en carretera en el mundo [106].

Respecto al efecto de la causa de muerte sobre la densidad endotelial Krohn y colaboradores, demostraron que patologías como el cáncer tienen un efecto negativo en la densidad celular endotelial, especialmente cuando se presenta en donantes de edad avanzada [107]. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con estos hallazgos, debido posiblemente a la menor edad de los donantes fallecidos con esta patología en nuestro medio.

Otras condiciones como: i) pterigion (grado 1), ii) depósitos de bilirrubina, iii) ectasias, iv) evidencia de cirugía refractiva y v) cuerpos extraños se presentaron en menos del 5% de los casos o estuvieron ausentes, hallazgos que no representaron una contraindicación para la obtención del tejido corneal.

Numerosos estudios se han realizado desde 1975 para conocer la morfología de las CEC. Entre ellos se destacan el de Laing y colaboradores quienes reportaron por primera vez el aspecto morfológico poligonal característico de las CEC humanas *in vivo* por medio del uso de microscopía especular de contacto [108]. En estudios posteriores Suda y colaboradores

corroboraron el aspecto poligonal (hexágono) de las CEC [109]. Dichos resultados son consistentes con los nuestros, en los que observamos a las CEC organizadas como una monocapa con células de aspecto poligonal.

Por otro lado, Karim y colaboradores describen al ECAC como una monocapa celular de aspecto poligonal y densamente empaquetada en el polo anterior del cristalino [81]. En lo que respecta a la relación núcleo-citoplasma en las células del ECAC, esta ha sido descrita como pequeña [110]. La descripción de ambos hallazgos concuerda también con los resultados de nuestro estudio.

En condiciones normales, las CEC secretan colágeno para formar la MD sobre la cual las CEC se organizan para formar una monocapa celular compacta. Una composición adecuada de esta membrana basal es indispensable para el mantenimiento de la morfología característica de las CEC. Levy y colaboradores han demostrado que en condiciones patológicas, la MD modifica su composición normal [111]; estos cambios se encuentran asociados no solo a la pérdida de la morfología de las CEC, sino también a una reducción de la densidad celular normal del endotelio corneal; esta condición es observada en patologías como la distrofia endotelial de Fuch [112,113], una de las principales indicaciones de trasplante corneal [114]. La MD está formada por colágeno tipo VIII, el cual se encuentra organizado a manera de una red que se observa como una superficie irregular bajo el microscopio electrónico [86], esta descripción es similar a la encontrada en nuestros resultados al analizar la superficie de la MD.

Las células del ECAC se encuentran en contacto directo con la CAC, la cual envuelve completamente el cristalino formando un sistema cerrado. En nuestros resultados, la CAC se observa como una superficie de características homogéneas; según lo reportado esta característica está asociada a la composición a partir de colágeno tipo IV de esta membrana basal (43).

2.5 Conclusiones.

Los donantes de córnea correspondieron en su mayoría a individuos del género masculino, entre los 19-37 años de edad, cuya principal causa de muerte se asoció a eventos cerebrovasculares.

En cuanto a las características corneales, la mayoría del tejido correspondió a córneas con un espesor entre 500-558 μm y con una densidad celulares óptima entre 2400-3400 células/ mm^2 .

A partir de los tejidos oculares considerados de desecho tras la procuración de la córnea, es posible obtener a partir del cristalino el ECAC, un tejido que presenta una citoarquitectura muy similar a la del endotelio corneal nativo en cuanto a: i) disposición en monocapa celular densamente empaquetada, ii) con células de aspecto poligonal y iii) sobre una membrana basal con características similares a la MD con tendencia natural a enrollarse sobre sí misma. Por lo tanto, estructuralmente el ECAC podría ser considerado como un sustituto adecuado del endotelio corneal.

3

Caracterización de los marcadores estructurales y funcionales de las CEC en las células del ECAC y expresión génica de marcadores de “bomba y barrera “de las CEC en las células del ECAC.

3.1 Introducción.

Para considerar un sustituto del endotelio corneal como óptimo, no solo debe presentar una disposición en monocapa compacta con células de aspecto poligonal sobre una membrana basal; también es necesario que exprese los marcadores específicos para las CEC.

La polaridad celular consiste en una organización estructural y asimétrica que divide la membrana plasmática en los dominios: apical, lateral y basal [115], esto condiciona una distribución particular de las proteínas involucradas en: i) la unión célula-célula, ii) el transporte, iii) el citoesqueleto y iv) la unión célula-matriz extracelular (MEC). Estas proteínas son esenciales en la regulación del flujo de solutos y líquido para el mantenimiento de la transparencia y nutrición corneal.

3.1.1 Proteínas de unión célula-célula

Las CEC permanecen unidas entre ellas por la interacción de proteínas de la superficie celular, entre las que se encuentran: ZO-I, conexinas (Cx) y moléculas de adhesión celular neural (NCAM).

3.1.1.1 ZO-I

Es un tipo de unión celular que se encuentra en el dominio apical de las células que se organizan en monocapas, su componente transmembranal interactúa con su contraparte homolateral en las células vecinas para formar una barrera entre compartimientos y regular el transporte de moléculas de un lado a otro [116][117]. En la porción apical de las CEC, la ZO-I forma una barrera que limita el movimiento de las moléculas del humor acuoso al estroma adyacente, esto representa la función de barrera del endotelio corneal [118]. Además, estas uniones celulares permanecen unidas físicamente a las proteínas que conforman el citoesqueleto de las CEC contribuyendo al mantenimiento de la morfología poligonal característica.

3.1.1.2 Cx

Son proteínas de unión celular que participan en el intercambio de iones, segundos mensajeros y pequeños metabolitos [119]. En las CEC, la Cx 43 se encuentra localizada como puntos discontinuos en la porción sub-apical y lateral de su membrana plasmática [65][72]; estas proteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio corneal; las alteraciones de la estructura de la Cx 43 se encuentran relacionadas a la pérdida del estado normal de quiescencia de las CEC [120].

3.1.1.3 NCAM

Son moléculas de adhesión relacionadas con el reconocimiento celular [121]. Su expresión en las CEC se encuentra restringida a la membrana lateral caracterizada por su disposición en pliegues, que aumentan en complejidad desde el polo apical al basal; esta disposición de la membrana lateral contribuye a la función de barrera de las CEC [122].

3.1.2 Proteínas de transporte

Para transportar moléculas específicas de un lado a otro de la célula, varias proteínas especializadas se encuentran en la membrana de las CEC, entre las que se encuentran la Na^+K^+ /ATPasa y las acuaporinas (AQP).

3.1.2.1 Na^+K^+ /ATPasa

Es una proteína responsable del establecimiento y mantenimiento del gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. En las CEC, esta proteína está relacionada con el transporte de líquido del estroma al humor acuoso, este mecanismo es crítico para el mantenimiento del espesor y la transparencia corneal, las subunidades alfa-1 y alfa 3 se encuentran en elevada densidad en las CEC [123].

3.1.2.2 AQP

Son canales de agua transmembrana que juegan un papel crítico en el movimiento del agua a través de la membrana de las CEC para nutrición, eliminación de sustancias de desecho y regulación de líquidos necesarios para el mantenimiento de la transparencia corneal. La AQP-1 se encuentra localizada en toda la superficie de las CEC y está involucrada en la regulación de líquido y del volumen celular [124] [125,126].

3.1.3 Proteínas del citoesqueleto

La polaridad celular también involucra la organización asimétrica de las proteínas que forman parte del citoesqueleto, en las CEC encontramos una red de actina-miosina y vimentina (VIM)

3.1.3.1 Red de actina-miosina.

De manera habitual el citoplasma de las células se encuentra ocupado por una red de filamentos de actina densamente empaquetados, que interactúan con miosina y proveen un mecanismo de soporte para el mantenimiento de la morfología celular.

En las CEC, la red de actina-miosina se encuentra altamente organizada en el dominio apical y en íntimo contacto con la ZO-1 de estas células [72] [127,128]. La organización particular de esta red confiere a esta zona un aspecto poligonal característico, además de una estructura rígida capaz de resistir el estrés mecánico generado por la presión intraocular [129] [72].

3.1.3.2 VIM

Es un filamento intermedio que participa en el mantenimiento de las características mecánicas de las células [130], protegiendo contra el efecto compresivo generado por la presión intraocular [72]. En las CEC, la VIM se encuentra distribuida en todo el citoplasma, inmediatamente por debajo de la red de actina-miosina en el borde apical de las CEC. [72,131] [132] [133].

3.2.4 Proteínas de unión a la matriz extracelular

Adicionalmente a las uniones que mantienen unidas las células entre si, estas permanecen ancladas a los componentes de la matriz extracelular de las membranas basales; las integrinas son receptores transmembrana encargadas de esta unión [134] [135]. En las CEC las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ han sido detectadas en su unión a la MEC de la MD[136], compuesta principalmente por COLVIII y COLIV [24,25][26].

La combinación de la presencia y función de estas proteínas permite el desarrollo de un sistema circulatorio interno que permite el transporte de solutos a través de la membrana de las CEC junto con un componente de barrera, este mecanismo es esencial en el mantenimiento de la transparencia corneal [137].

Las proteínas descritas se consideran como marcadores específicos de las CEC (tabla 1), y han sido reportados como ausentes en las células del epitelio corneal, en el estroma e incluso en poblaciones adyacentes al endotelio corneal como es la región trabecular [72].

Proteínas especializadas en la membrana de las CEC			
Proteína	Función	Localización	Referencia
ZO-I	Proteína de unión	Dominio apical	[72,118]
Cx	Proteínas de unión Comunicación celular	Dominio lateral	[65]
NCAM	Proteínas de unión	Dominio lateral	[138]
Na ⁺ K ⁺ /ATPasa	Proteínas de transporte	Dominio lateral	[123]
AQP	Proteínas de transporte	Dominio lateral	[125,126]
Actina	Citoesqueleto	Dominio apical	[72]
Miosina	Citoesqueleto	Dominio apical	[72]
Integrinas	Proteínas de unión MEC	Dominio basal	[72] [136]

Membrana basal	MEC	Región basal de las CEC	COLVIII [24,25] COLIV [26]
-----------------------	-----	-------------------------	-------------------------------

Con el fin de establecer similitudes, en este capítulo analizaremos la presencia de los marcadores estructurales y funcionales específicos de las CEC: i) ZO-i, ii) Na⁺K⁺/ATPasa, iii) VIM, iv) NCAM, v) AQP-1, y vi) Cx-43 en el ECAC. Además, se determinará la presencia de COLIV principal componente de la CAC en la MD

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Donantes.

El tejido humano fue manejado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Los tejidos oculares (córnea y cristalino) fueron obtenidos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, España; a partir de donantes cadavéricos sanos de acuerdo con las leyes españolas. La edad media de los donantes fue de 63±2.17 años.

3.2.2 Preparación de las muestras.

El endotelio corneal fue obtenido de anillos corneo esclerales luego de la obtención del botón central de la córnea para queratoplastia penetrante o endotelial por medio de la técnica DMEK. La densidad celular endotelial promedio fue de 2,653±82.51 células/mm². Se realizó una tinción de vitalidad con azul de tripano durante 60 segundos para verificar la viabilidad de las CEC sobre la MD aun adherida al estroma corneal, se realiza lavado con solución salina balanceada (BSS),.

Bajo microscopio estereoscópico (Leica, Alemania) y con pinzas de microdissección (Rumex, EUA) se realizó el aislamiento del endotelio corneal siguiendo la línea de Schwalbe como referencia, separándolo cuidadosamente del estroma corneal subyacente. Luego de su

aislamiento el endotelio corneal se lavó con BSS y se colocó en una placa de Petri para su análisis. Posterior a la obtención de la córnea, los tejidos oculares remanentes fueron recuperados, entre ellos el cristalino, el cual se obtuvo mediante corte de las fibras de la zónula ciliar con tijeras (Rumex, EUA) y pinzas de microdissección (Rumex, EUA). La CAC con su epitelio integro se aisló cuidadosamente del cuerpo del cristalino, luego de un procedimiento de capsulorrexis en 360°. La CAC con su epitelio se lavó con solución de BSS y se colocó en una placa de Petri para su análisis.

3.2.3 Análisis por inmunohistofluorescencia

Las CEC y ECAC en sus respectivas membranas basales se dividieron en dos partes. La primera mitad se crio-preservó en sucrosa al 30% a 4°C por 24 horas, se congeló y se embebió en Tissue-TekR C.C.T.T.M Compaund (Sakura Finitek Europe B.V., Holanda). Posteriormente se realizaron cortes de 10 µm de espesor utilizando un criostato (Leica, Alemania) los cuales se colocaron en laminillas comerciales (Fisher-Scientific, EUA). Las muestras se lavarón dos veces con PBS por 10 minutos y luego se permeabilizaron con una solución de Triton-X100 al 0.3% preparada en PBS durante 10 minutos. Posteriormente los cortes se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: i) ZO-1 (1:100) (Life technologies, USA), ii) Na⁺K⁺/ATPasa (1:100) (Millipore, EUA), iii) Cx43 (1:100) (Sigma Aldrich), iv) VIM (1:100) (Abcam, UK), v) AQP-1 (1:100), vi) NCAM (1:100) (Abcam, UK) y vii) colágeno tipo IV hecho en conejo (1:100) (Abcam, UK). Después de la incubación con el anticuerpo primario los cortes fueron lavados 3 veces x 10 minutos con PBS para continuar con la incubación de 2 horas, a temperatura ambiente, con los siguientes anticuerpos secundarios: i) IgG (H+L) anti-ratón rodaminada (Rho) hecho en burro (1/60; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA), 2) IgG fluoresceinada (FITC) anti-conejo hecho en cabra (1/60; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente los cortes se lavaron con PBS 3 veces por 10 minutos cada lavado y se contratiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización de los núcleos. Después de agregar Vectashield los cortes fueron cubiertos con cubreobjetos de vidrio. Los tejidos se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania).

La segunda mitad de la muestra se utilizó para la visualización de las células en confluencia, el tejido se colocó sobre una laminilla tratada comercialmente (Fisher-Scientific, Pittsburg) y se realizó el mismo protocolo de inmunofluorescencia descrito previamente utilizando los mismos marcadores y equipo.

3.2.3 Extracción de RNA y q-PCR

Para realizar el análisis de expresión génica, el RNA de las CEC sobre la MD y la ECAC sobre la CAC fue extraído mediante el Mini-kit Illustra RNAspin (GE Healthcare). El grado de pureza de los RNAs fue revisado tomando como referencia la relación A260/A280, la concentración individual del RNA de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría. Luego 0.5 μ m del total del RNA de cada muestra fue utilizado para conversión del RNA a cDNA usando el Master Mix High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones técnicas (60 min a 37 °C, 5 min at 95 °C y mantenimiento a 4 °C). Los primers para los genes Na⁺K⁺/ATPasa, ZO-I y actina (ACTB) como gen constitutivo, fueron diseñados utilizando la herramienta PrimerBLAST y sintetizados por Sigma Aldrich (tabla 2) El análisis de expresión fue realizado por cuantificación relativa (método $\Delta\Delta$ Ct) en el sistema de PCR Tempo Real (Applied Biosystems) utilizando el Master Mix Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Cada muestra fue analizada por triplicado en diferentes experimentos. Los resultados fueron analizados utilizando el software (Applied Biosystems).

Gen		Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto	Numero de acceso
Na ⁺ K ⁺ /ATPasa	F	TCCCAATTCACCTGTTGGGC	154	NM_001185060.1
	R	TGCACCACCACGATACTGAC		
ZO-I	F	GAACCAAAGCCTGTGTATGCC	113	NM_001301025.1
	R	CTGGGCCGAAGAATCCCATC		
ACTB	F	ATTCCAAATATGAGATGCGTTGTT	101	NM_001101.3
	R	GTGGACTTGGGAGAGGACTG		

Tabla 2. Secuencia de primer utilizados para el gen Na⁺K⁺/ATPasa, ZO-I y ACTB

3.2.4 Análisis de datos.

Los datos son presentados como la media \pm DE. La comparación entre grupos experimentales se realizó utilizando ANOVA, un valor $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

3.3 Resultados.

La evaluación de los marcadores específicos de las CEC en el ECAC por medio de inmunofluorescencia, mostro que:

La ZO-1 (Fig 38) y la bomba de Na+K+/ATPasa (Fig 39) se encontraron localizadas en las membranas laterales formando bordes delgados y definidos en las (a) CEC y en las (c) células del ECAC, observándose el aspecto característico en panal de abeja al visualizar ambas poblaciones celulares en confluencia. En el corte transversal se muestra marcaje positivo en la disposición en monocapa como células aplanadas en el endotelio corneal y cubicas en el ECAC.

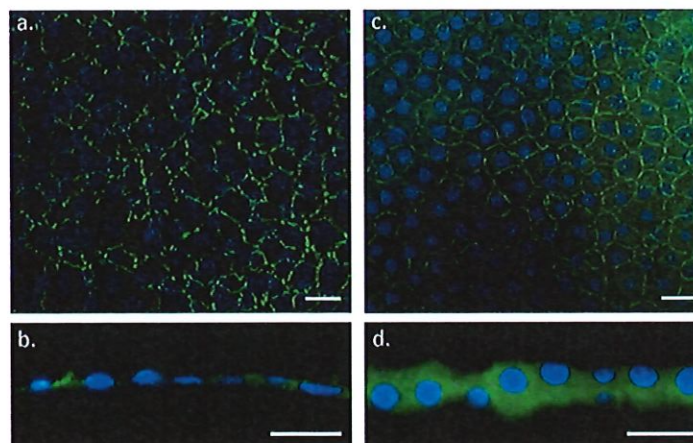


Figura 38. *Inmunohistofluorescencia para ZO-1. En CEC sobre MD en (a) confluencia (corte vertical) y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.*

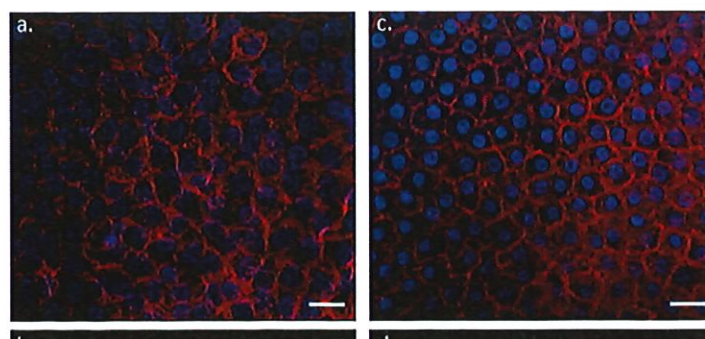


Figura 39. Inmunohistofluorescencia para $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$. En CEC sobre MD en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.

La Cx-43 (Fig 40) se encontró localizada de manera difusa en las (a) CEC y en las (c) células del ECAC al ser observadas en confluencia; sin embargo, presenta focalización en ciertas zonas de las membranas basolaterales de las CEC, dando un aspecto de borde discontinuo. En el corte transversal se muestra marcaje positivo en la disposición en monocapa de las (b) CEC y (d) ECAC.

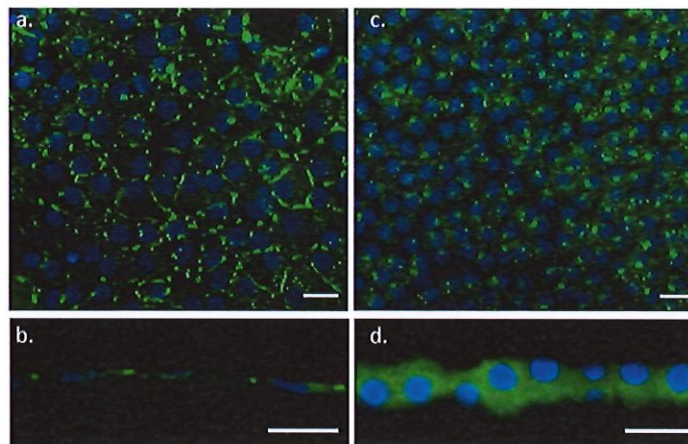


Figura 40. Inmunohistofluorescencia para Cx43. En CEC sobre MD en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.

La VIM (Fig 41) mostró un marcaje positivo en el citoplasma de las (a) CEC y de las (c) células del ECAC sin predominio de localización al observar ambas poblaciones celulares en confluencia y en el corte transversal.

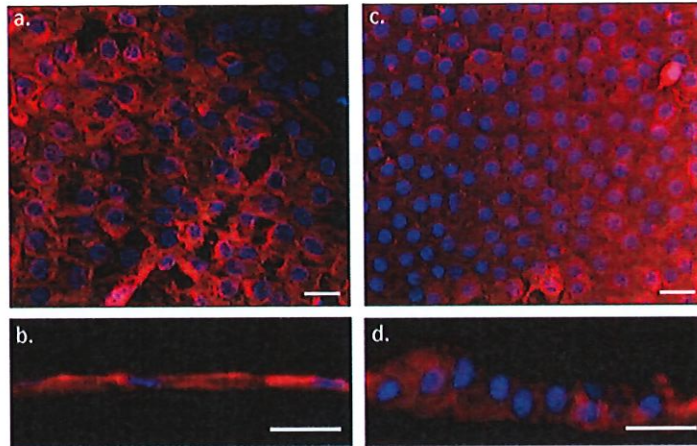


Figura 41. Inmunohistofluorescencia para VIM. En CEC sobre MD en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.

La AQP-1 (Fig 42) se encontró localizada en las membranas laterales formando bordes amplios con aspecto de pliegues, más definidos en las células del (c) ECAC en comparación con las (a) CEC, observadas en confluencia. En el corte transversal se muestra marcaje positivo en la disposición en monocapa de las (b) CEC y (d) ECAC.

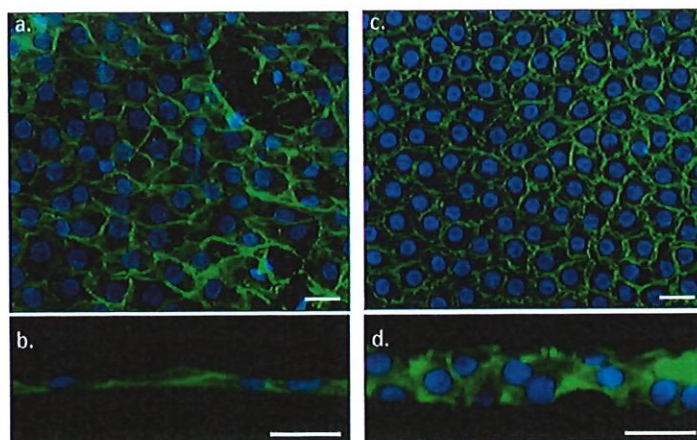


Figura 42. Inmunohistofluorescencia para AQP-1. En CEC sobre MD en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.

La NCAM (Fig 43) mostró un marcaje positivo dando un aspecto de bordes grueso en las membranas laterales de las (a) CEC y las células del (c) ECAC. En el corte transversal se muestra marcaje positivo en la disposición en monocapa de las (b) CEC y (d) ECAC.

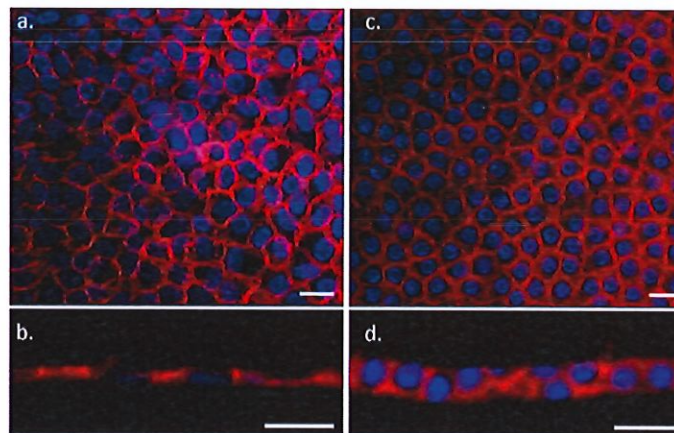


Figura 43. Inmunohistofluorescencia para NCAM. En CEC sobre MD en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en ECAC sobre CAC en (c) confluencia y (d) corte transversal.

El COLIV (Fig 44) se detectó en la (a-b) MD, con particular localización en el lado estromal; y en todo el espesor de la (c-d) CAC.

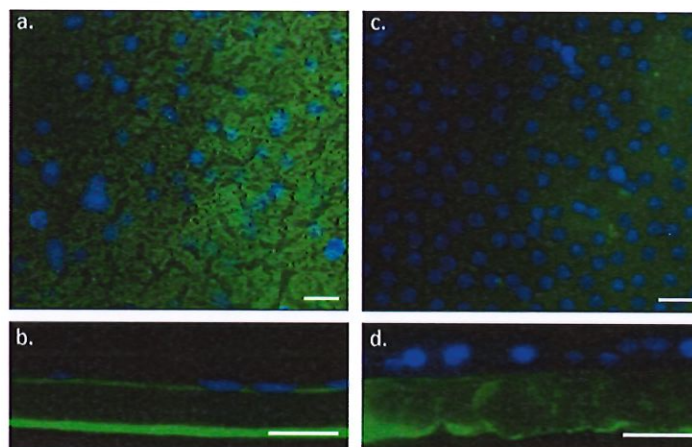


Figura 44. Inmunohistofluorescencia para COLIV. En la MD con las CEC en (a) confluencia y (b) corte transversal; y en la CAC con el ECAC (c) confluencia y (d) corte transversal.

La evaluación de los marcadores para Na^+K^+ /ATPasa y ZO-1 por medio de análisis de expresión génica, mostro que: La expresión del gen de Na^+K^+ /ATPasa en las muestras de CEC y de células del ECAC es similar, siendo ligeramente mayor en las muestras de CEC (Fig 45). El análisis estadístico de los resultados no mostro diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen Na^+K^+ /ATPasa de las muestras de CEC y células del ECAC.

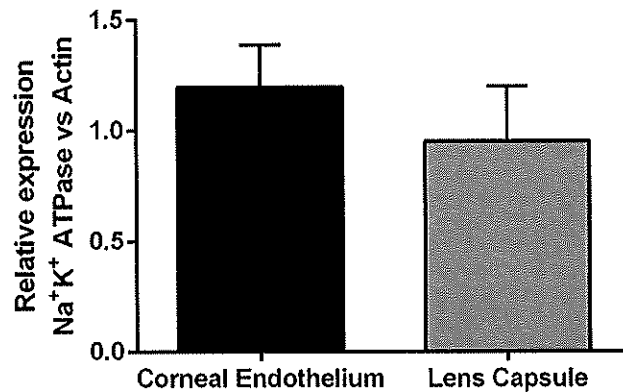


Figura 45. Análisis de expresión relativa de RNAm de Na^+K^+ /ATPasa/ACTH en las CEC y ECAC. El análisis demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas. Datos de n=4 muestras CEC vs 4 muestras de ECAC.

La expresión del gen de ZO-1 en las muestras de CEC y de células del ECAC es similar, siendo ligeramente mayor en las muestras de ECAC (Fig 46). El análisis estadístico de los resultados no mostro diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen ZO-1 de las muestras de CEC y células del ECAC.

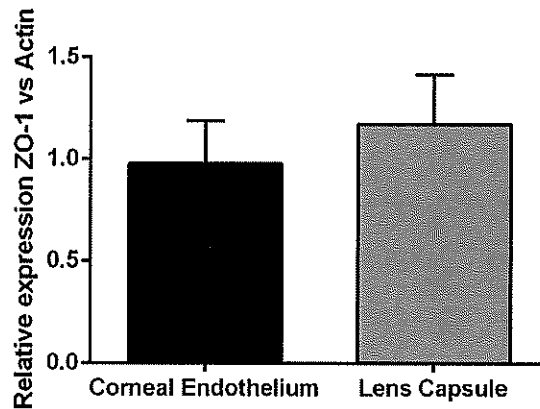


Figura 46. Análisis de expresión relativa de RNAm de ZO-1/ACTH en las CEC y ECAC. El análisis demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas. Datos de n=4 muestras CEC vs 4 muestras de ECAC.

3.4 Discusión.

Se ha descrito que en la región central del ECAC y del endotelio corneal existe una elevada actividad $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$, las cuales son responsables del mantenimiento de la concentración de iones y de la cantidad de agua, que permiten la transparencia del cristalino y la córnea[139]. El componente funcional de esta bomba es la sub-unidad alfa, en el ECAC hay una distribución polarizada de dos tipos de sub-unidades: alfa-3 en la CAC en íntimo contacto con el humor acuoso y la sub-unidad alfa-1 en contacto con las fibras del cuerpo del cristalino [140,141]. Se ha demostrado que esta sub-unidades tienen la capacidad de cambiar la polaridad de su distribución para mantener la homeostasis del cristalino [142].

De manera semejante a reportes previos, nuestros hallazgos determinaron que el ECAC y las CEC presentaron inmunoreactividad para la bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$. Delamere y colaboradores describieron que en la región central del ECAC existe una elevada actividad $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{ATPasa}$, la cual también fue observada en los estudios de Garder y colaboradores los cuales demostraron por medio de técnicas de inmunocitoquímica la presencia de este

marcador en el ECAC, señalando además que este componente funcional presenta una distribución polarizada de dos tipos de sub-unidades: la alfa-3, en íntimo contacto con el humor acuoso y la sub-unidad alfa-1 en contacto con las fibras del cuerpo del cristalino. Se ha demostrado que estas sub-unidades tienen la capacidad de cambiar la polaridad de su distribución para mantener la homeostasis del cristalino [142]. En el ECAC, al igual que en las CEC, la actividad de la bomba actividad Na^+K^+ /ATPasa está asociada al mantenimiento de una adecuada concentración de iones y cantidad de agua para el mantenimiento de la transparencia del cristalino y córnea [139]

Nuestros resultados también mostraron un marcaje positivo para las uniones celulares estrechas tipo ZO-1 en el ECAC y CEC. Este marcador en el ECAC cumple un papel importante en la regulación de la permeabilidad a través de la CAC, como ha sido descrito por Saika y colaboradores [82]. La co-expresión de ambos marcadores estaría en concordancia con los estudios de Dahm y colaboradores al señalarlos como necesarias para el mecanismo de bomba y barrera indispensable para la correcta movilización de líquido y solutos, lo que conlleva al mantenimiento de la transparencia en el cristalino [143].

Asociada a la membrana de las células del ECAC se encuentran marcadores tipo NCAM, los cuales han sido identificados en las paredes basolaterales de estas células, los cuales han sido relacionados al mantenimiento del estado de quiescencia de las células del ECAC al evitar su diferenciación a fibras en el cristalino [144]. En las CEC la presencia de esta proteína está asociada al mantenimiento de la función de barrera.

Williams K et al. mediante estudios de inmunohistoquímica determinaron la presencia de Cx-43 en las células del ECAC [65], mientras XXX y colaboradores lo hicieron en en las CEC, hallazgos que concuerdan con nuestros resultados. Otros autores han descrito la expresión de Cx-50 junto con Cx-43 en estas células. No obstante, nuestros estudios estuvieron solo orientados a la detección de Cx43, por ser considerada como un marcador característico de las CEC [72]. Otros marcadores como la AQP han sido relacionadas al mantenimiento de la transparencia tanto del cristalino como de la córnea [63,145]. Al

igual que en nuestros resultados Mathias RT et al. demostraron la presencia de AQP-1 en el ECAC [146]; junto con la AQP-5 ha sido descrita como la responsable del transporte de líquidos en córnea [63,64].

Zhiguo He y colaboradores determinaron la presencia de VIM en el citoesqueleto de las CEC, proteína asociada a la función de contrarrestar el efecto del estrés inducido por efecto de la presión intraocular. Nuestros resultados demuestran la inmunoreactividad para VIM tanto en las CEC como en el ECAC; es de resaltar que este último tejido al tratarse también de una monocapa celular intraocular expuesta al efecto de la presión intraocular (PIO), la presencia de VIM podría relacionarse con un efecto protector.

La MD y la CAC comparten características similares, como es la expresión de COLIV. La expresión de esta proteína en la CAC ha sido relacionada con su composición, como ha sido descrito por Brinker J y colaboradores donde este tipo de colágeno es el mayor componente de esta membrana basal [85], resultado que concuerda con los nuestros, en el que mostramos un marcaje positivo en toda el espesor de la CAC. En contraste con la MD, la expresión de esta proteína solo se observa en el lado estromal, esta distribución también ha sido observada en otros estudios como el de Halfter y colaboradores donde se asocia a la bipolaridad de la MD [147]. Esta estructura ha sido descrita como necesaria para la adhesión de la MD al estroma posterior [87].

3.5 Conclusión

Nuestro estudio revela que los marcadores considerados como esenciales en el mantenimiento de la transparencia corneal forman parte de la citoarquitectura de las células del ECAC (bomba de Na^+K^+ /ATPasa, uniones celulares tipo ZO-1, VMT, NCAM, AQP-1 y Cx43), lo que respalda la idea de considerar a esta monocapa como un sustituto del endotelio corneal. Y supone la idea de que su trasplante podría recuperar la transparencia corneal. Adicionalmente, la CAC comparte con la superficie estromal de la MD la presencia de COLIV. A pesar de que la expresión de la Na^+K^+ /ATPasa y la ZO-1 es común en otros

tipos celulares, la co-expresión de estos marcadores es frecuentemente asociada a la identificación de una de las mayores funciones del endotelio corneal para mantener la transparencia corneal: el mecanismo de bomba y barrera, también presente en las células del ECAC.

4

Modelo pre-clínico de queratopatía bullosa en conejo blanco de Nueva Zelanda para trasplante de sustitutos del endotelio corneal.

4.1 Introducción

La QB ocasiona la opacificación de la córnea secundario a la falla de la función de “bomba y barrera” de las CEC [37]. La escasez de donantes para realizar la sustitución del endotelio enfermo por cualquiera de las técnicas de queratoplastia corneal han promovido las estrategias basadas en el uso de los SEC obtenidos por ingeniería de tejidos [69,148].

Para la evaluación del potencial terapéutico de esta estrategia diferentes modelos pre-clínicos que imitan la insuficiencia endotelial de la QB han sido descritos. Los métodos más frecuentes para inducir estos modelos incluyen: la lesión mediante congelamiento trans-corneal [149–153] y la administración intra-cameral de sustancias tóxicas como cloruro de benzalconio o hidróxido de sodio (Fig 47) [154–156]. Sin embargo, estos métodos tienen algunas desventajas: i) no selectivos, debido a que dañan otras estructuras además del EC [157]; ii) complejos, ya que requieren estandarización de la dosis a utilizar [4]; e iii) inadecuados, en especial para el trasplante de SEC, ya que después de la lesión las CEC se pierden pero la MD permanece intacta [158], siendo esto un factor de riesgo para el desprendimiento del SEC después de su trasplante [159].

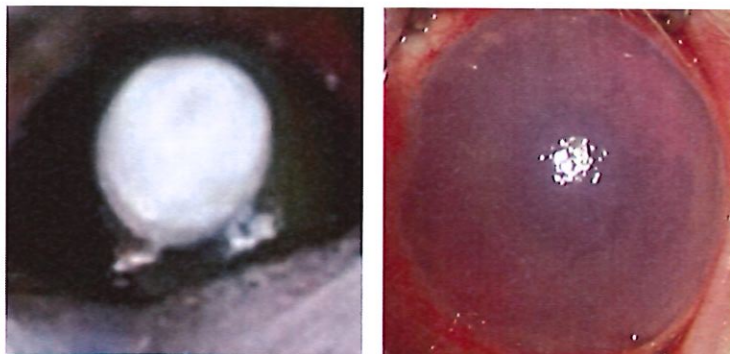


Figura 47. Métodos utilizados con frecuencia para el desarrollo de insuficiencia endotelial. (A) Lesión criogénica, e (B) inyección intra-cameral de sustancias tóxicas. Imágenes adaptadas de [149,156,160].

Como alternativa, diferentes estudios han descrito la descemetorrexis quirúrgica mediante una espátula elaborada a mano para remoción del EC (Fig 48) [9,69,161]. Sin

embargo, la técnica, la descripción de las características clínicas y los cambios patológicos en el resto de las capas de la córnea después del procedimiento son poco descritas. Además, de nuestro conocimiento, una descemetorrexia bajo burbuja de aire no ha sido descrita en un modelo de conejo.

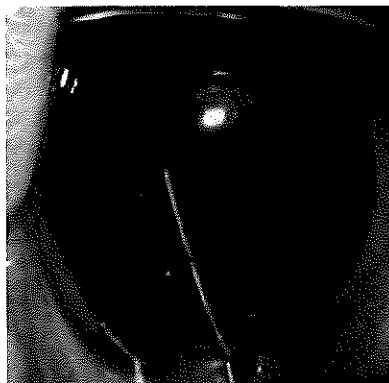


Figura 48. Descemetorrexia quirúrgica. Remoción del EC mediante una espátula endotelial en una cámara anterior llena de humor acuoso. Imagen adaptada de [9].

Aun cuando una parte importante del éxito en un procedimiento de descemetorrexia depende del entrenamiento y de las habilidades de quien la realiza, una adecuada descripción de la técnica puede: i) hacer el procedimiento más sencillo, ii) aumentar las posibilidades de una adecuada remoción del EC, iii) evitar un daño innecesario en el estroma, y iv) reducir el número de animales utilizados para el estudio, en congruencia con los principios de Russell y Burch para el uso ético de animales de experimentación [162].

En este capítulo hacemos una descripción detallada de la descemetorrexia bajo burbuja de aire para establecer y validar un modelo pre-clínico de insuficiencia endotelial en conejo, que reproduzca las características clínicas e histopatológicas de la QB en humanos para probar estrategias basadas en el trasplante de SEC.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Animales

Cuatro conejos blancos de Nueva Zelanda (machos de 2-3 meses de edad y 2-3 kg de peso) fueron utilizados en este experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad (60 ± 10 %), con ciclos de luz-obscuridad (12:12 hrs) y suministro de alimento y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Todos los procedimientos se realizaron con aprobación del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia y en congruencia con los “ARVO Statements for the use of animals in ophthalmology and vision research” [163].

4.2.2 Elaboración de la espátula endotelial

La espátula endotelial se elaboró doblando el bisel de una aguja 26-G de 10 mm de largo (Alfasafe, Colombia) hasta 45° utilizando un porta-agujas (Rumex, Alemania). Posteriormente la punta del bisel se cortó con tijeras quirúrgicas (Miltex, Alemania) para dar una forma espatulada. La aguja modificada se conectó a una jeringa de 5 mL (Alfasafe, Colombia) (Fig 49) y antes de su uso se verificó el paso de aire a través de la aguja.



Figura 49. Espátula endotelial. (A) Aspecto general de la espátula endotelial conectada a una jeringa de 5 mL, y (B) aspecto de la aguja modificada tras doblar el bisel hasta 45° y cortar la punta, para obtener una forma de espátula.

4.2.3 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con una mezcla de 20 mg/kg de hidroclicloruro de ketamina (Brouwer, Argentina) y 2 mg/kg de hidroclicloruro de xilacina (Erma, Colombia) administrados por vía intramuscular. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia: la región palpebral de cada animal se desinfectó con clorhexidina (Quirucidal,

Colombia) y se lavó con solución de cloruro de sodio al 0.9% (PiSa, México), posteriormente los ojos se desinfectaron con povidona iodada al 10% (OQ-Septic, Colombia) y se lavaron con solución salina balanceada (SSB) (Alcon, Chile). Los ojos se anestesiaron mediante la instilación de una gota de una mezcla de 1 mg/mL de hidrocortisona y 4 mg/mL de hidrocortisona (Alcon, Colombia), después un blefaróstato (Rumex, USA) se colocó para retraer los párpados y exponer la superficie corneal. Un microscopio quirúrgico oftalmológico (OPTI 1 FR, Zeiss, Alemania) se utilizó para realizar el procedimiento quirúrgico: para acceso a la cámara anterior del ojo se realizó una incisión corneal a 2 mm del limbo con un cuchillete oftalmológico recto de 15° (MANI, Japón) en posición quirúrgica de las 4 en las manecillas del reloj, una pinza tipo colibrí con un diente (Rumex, EUA) se utilizó para estabilizar el ojo. Para comenzar la descemetorrexia y tener una mejor visualización del EC, la cámara anterior del ojo se llenó con una burbuja de aire (aproximadamente 1-2 marcas de la escala, equivalente a 200-400 μ L) utilizando la jeringa conectada a la espátula endotelial; después la MD se desgarró y se removi6 del estroma con un movimiento continuo y curvo, para así obtener un colgajo que se traccion6 en direcci6n a la incisi6n inicial para realizar una descemetorrexia de 8-9 mm de diámetro con exposici6n del estroma posterior (Fig 50).

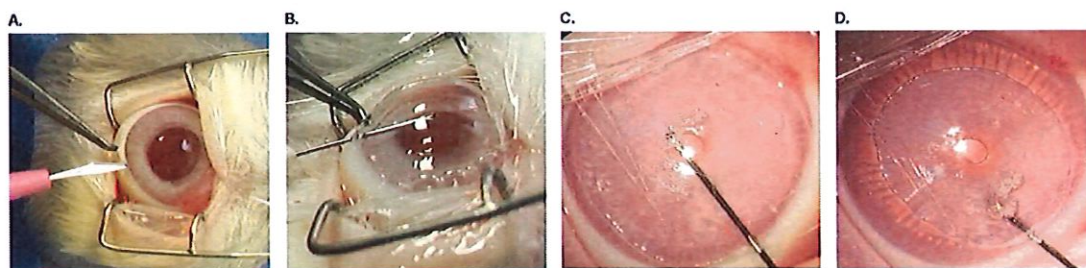


Figura 50. Procedimiento de descemetorrexia quirúrgica bajo burbuja de aire. (A) Acceso a la cámara anterior del ojo, (B) inyección de aire para ampliación de la cámara anterior, (C-D) descemetorrexia circular utilizando la espátula endotelial.

La pérdida o disminución de la burbuja de aire durante la manipulación para realizar la descemetorrexia se compensó en el momento mediante la re-inyección de aire. Al finalizar el procedimiento, la MD diseccionada y la burbuja de aire se removi6 de la cámara

anterior utilizando la misma espátula y después la incisión corneal se selló mediante la hidratación de los bordes de la herida con SSB. Durante el periodo post-operatorio, una gota de una mezcla de 5 mg/mL de moxifloxacino y 1 mg/mL de dexametasona (Tecnofar, Colombia) en solución oftálmica se aplicaron en el ojo derecho 2 veces al día por 7 días.

4.2.4 Evaluación pre- y post-operatoria

El ojo derecho de cada animal se examinó en los días pre- (0) y post- (1, 7, 14, 21 y 28) operatorios por personal especializado para la evaluación de: i) transparencia corneal, ii) área de tinción epitelial corneal (ATEC), iii) espesor central corneal (ECC) y iv) diámetro corneal. También, se evaluaron características morfológicas de las CEC como: i) densidad endotelial, ii) coeficiente de variación (CV) del tamaño, iii) morfología hexagonal, iv) tamaño promedio, v) tamaño mínimo, y vi) tamaño máximo.

4.2.4.1 Transparencia corneal

Para evaluar la transparencia corneal y el segmento anterior del ojo se utilizó una lámpara de hendidura (DC4, Topcon, Japón) bajo las siguientes condiciones estándar: intensidad moderada, baja magnificación y luces ambientales apagadas. El filtro ámbar (Topcon, Japón) se utilizó para una vista general con iluminación difusa y haz de luz circular, y para una sección óptica de la córnea (3 mm de ancho, 14 mm de largo, en ángulo de 90°) con iluminación directa. Se realizó registro fotográfico por medio de una cámara (Topcon, Japón) adaptada a la lámpara de hendidura.

El grado de opacidad se determinó por dos observadores independientes y enmascarados de acuerdo con una adaptación de la escala de Fantes [164]: grado H0, córnea completamente clara con visualización de los detalles finos del iris y pupila; grado H1, opacidad corneal con visualización de los detalles del iris y la pupila como sombras; y grado H2, opacidad corneal prominente que interfiere con la visualización del iris y la pupila (Fig 51).

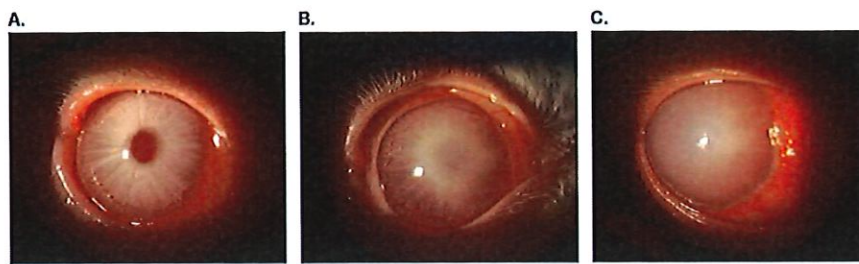


Figura 51. Clasificación clínica del grado de opacidad corneal. (A) Grado H0, (B) grado H1, y (C) grado H2.

4.2.4.2 ATEC

El epitelio corneal se examinó luego de la instilación de una gota de fluoresceína al 10% (Quifarmed, Colombia) en la parte interna del párpado inferior derecho. Se utilizó una lámpara de hendidura bajo condiciones estándar con el filtro azul (Topcon, Japón) para una vista general con iluminación difusa y haz de luz circular. Se realizó registro fotográfico de cada córnea. El grado del ATEC se determinó por dos observadores independientes y enmascarados de acuerdo con una adaptación de la escala de Miyata [165]: grado A0, sin tinción; grado A1, tinción en menos de un tercio; grado A2, tinción de uno a dos tercios; grado A3, tinción en más de dos tercios de la superficie corneal (Fig 52).

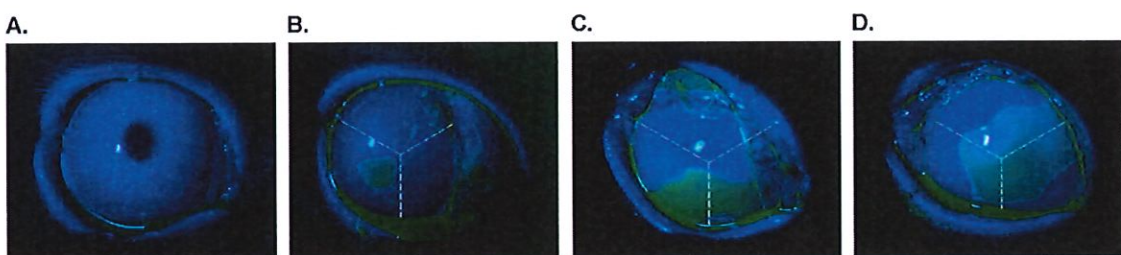


Figura 52. Clasificación clínica de ATEC. (A) Grado A0, (B) grado A1, (C) grado A2, y (D) grado A3.

4.2.4.3 ECC

Para determinar el ECC se utilizó un tomógrafo de coherencia óptica (TCO) (DRIOCT-I, Topcon, Japón). Se realizó una medición horizontal y una vertical utilizando la pupila como referencia para el centro de la córnea. Las imágenes se capturaron utilizando el modo

automático del equipo y el valor del ECC se calculó manualmente en una sección transversal de la córnea y se expresó en μm .

4.2.4.4 Diámetro corneal

Para determinar el diámetro corneal se utilizó un biómetro óptico (Lenstar LS 900, Haag-Streit International, Suiza). Se realizaron tres mediciones consecutivas de cada ojo y el valor calculado se expresó en mm.

4.2.4.5 Características morfológicas de las CEC

Para evaluar las características morfológicas de las CEC: i) densidad endotelial (CEC/mm^2), ii) CV del tamaño (μm), iii) morfología hexagonalidad (%), iv) tamaño celular promedio (μm), v) tamaño celular mínimo (μm), y vi) tamaño celular máximo (μm) en el centro del endotelio corneal se utilizó microscopía especular de no contacto (SP-3000P, Topcon, Japón). El análisis se realizó de manera automática utilizando el software de fábrica (Topcon) y las imágenes se registraron utilizando el modo automático del equipo con flash de baja intensidad.

4.2.4.6 Tejido animal

Al día 28, todos los animales fueron eutanaciados con una mezcla de 35 mg/kg de hidrocloreto de ketamina (Brouwer, Argentina) y 5 mg/kg de hidrocloreto de xilacina (Erma, Colombia) administrados por vía intramuscular, seguido de una inyección intracardiaca de 100 mg/kg de pentobarbital sódico (Penthal, Ecuador). Ambos ojos se enuclearon y las córneas se tallaron y se fijaron en formol (10%) para ser incluidas en parafina (Histoplas, Thermo-Scientific, EUA). Secciones de 5 μm se cortaron con un micrótopo (MicromHM 325, Thermo-Scientific, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para su análisis. Las córneas izquierdas se utilizaron como controles normales.

4.2.4.7 Análisis histológico

El tejido corneal se evaluó histológicamente por un patólogo calificado para estimar la presencia de: defectos epiteliales (microquistes y bullas), ii) área de separación de las lamelas estromales, y iii) espesor del tejido fibrótico formado. Las laminillas se examinaron utilizando un microscopio de contraste de fase (Axio Lab A1, Zeiss, Alemania). Se realizó registro fotográfico por medio de una cámara (Axio, Zeiss, Alemania) adaptada al microscopio y se analizó utilizando un programa especializado para el procesamiento de imágenes (AxioVision LE, Zeiss, Alemania).

4.2.5 Análisis estadístico

El programa Stat Graph Prism 5.0 se utilizó para realizar el análisis estadístico. Los datos se reportaron como la media \pm desviación estándar. La comparación entre grupos experimentales se realizó utilizando ANOVA seguido del test de Bonferroni, $p = < 0.0001$ y el test de Mann Whitney, $p = < 0.05$. La asociación o independencia de las variables categóricas se comparó utilizando el coeficiente de correlación Chi cuadrado de Person, y un valor $p < 0.0001$ fue aceptado como estadísticamente significativo.

4.3 Resultados

4.3.1 Transparencia corneal y ATEC

En la evaluación pre-operatoria con lámpara de hendidura todos los animales presentaron una córnea completamente clara, que permitió la visualización de los detalles finos del iris y la pupila en la vista general del segmento anterior (grado H0) (Fig 53A). A su vez en la sección óptica se observó una córnea curvilínea, uniforme y delgada formando la cámara anterior del ojo (Fig 53B), acompañada de una tinción epitelial negativa (grado A0) (Fig 53C). En contraste, en los días 1 y 7 del post-operatorio, la exploración en la vista general mostró córneas con una opacidad prominente que interfiere con la visualización del iris y la pupila (grado H2) (Fig 53A); mientras que en los días 14 al 28 las córneas mostraron una opacidad que permite la visualización de los detalles del iris y la pupila como sombras (grado H1) (Fig 53A). El análisis cuantitativo demostró que el grado de opacidad corneal

fue mayor en los días post-operatorios en comparación con el día pre-operatorio. A su vez, el grado de opacidad H2 se observó en el 100% de las córneas post-operadas en los días 1 y 7; en contraste con los días 14, 21 y 28 en los que el grado de opacidad fue H1 en el 75% de las córneas post-operadas ($p < 0.0001$) (Fig 53D).

En la sección óptica se observó edema estromal con mantenimiento de la cámara anterior del ojo (Fig 53B), estos hallazgos fueron persistentes a lo largo del tiempo.

Durante el periodo de estudio, la tinción epitelial permaneció constante (grado A0), sin diferencias estadísticamente significativas entre el día pre- y post-operatorios (Fig 53C-E).

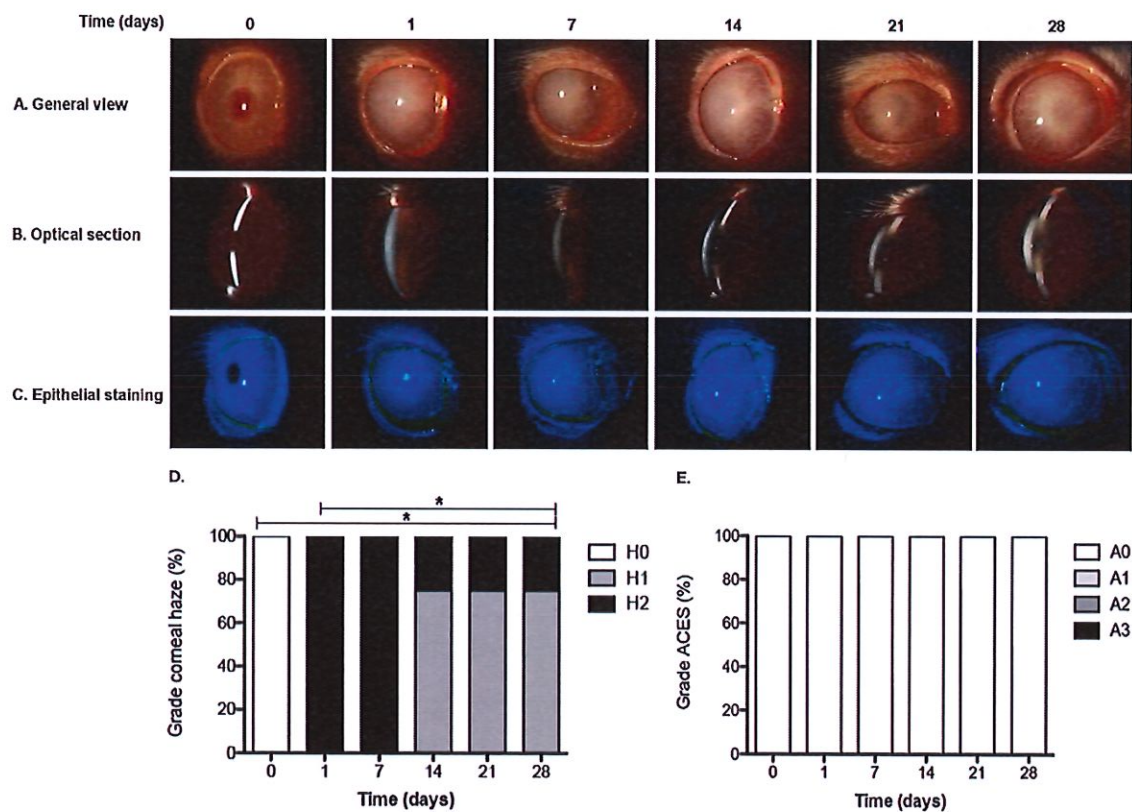


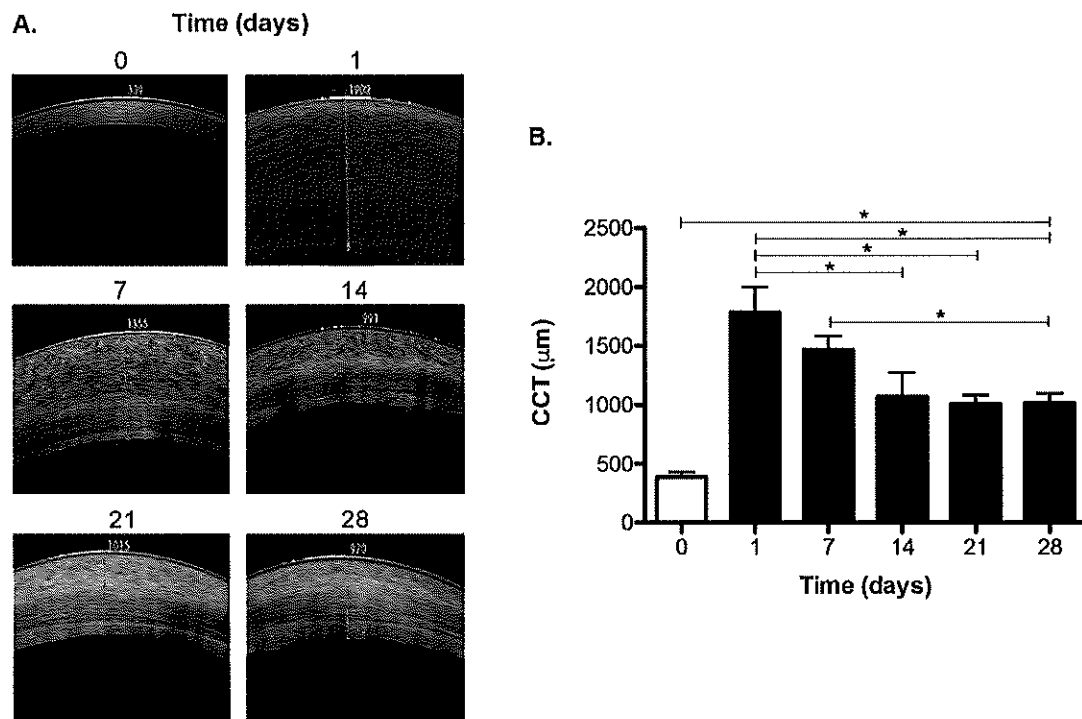
Figura 53. Aspecto clínico del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-operatorios. Imágenes representativas con lámpara de hendidura en una (A) vista general, (B) sección óptica y (C) tinción epitelial con fluoresceína. En el día pre-operatorio se observó una córnea transparente y delgada, mientras que en los días post-operatorios se observó opaca y edematosa; la tinción epitelial fue negativa a lo largo del estudio. (D) El análisis cuantitativo mostró los cambios significativos en el grado de opacidad corneal;

*después de la descemeterrexia las córneas perdieron su transparencia y desarrollaron una opacidad permanente. (E) No se observaron cambios significativos en el grado de ATEC en los días post-operatorios en comparación con el día pre-operatorio. Se utilizó el coeficiente de correlación Chi cuadrada de Person, * indica una diferencia significativa (valor $p < 0.0001$). Datos de $n=4$ animales de experimentación. Abreviatura: ATEC, área de tinción epitelial corneal.*

4.3.2 ECC

Las imágenes obtenidas por el TCO mostraron que después de la descemeterrexia quirúrgica todas las córneas tuvieron un aumento del ECC, al ser comparadas con las imágenes del día pre-operatorio (Fig 54A). El análisis de los datos mostró que la media en el ECC en el día pre-operatorio fue de $387.25 \pm 43.53 \mu\text{m}$, en contraste con los días post-operatorios en los que la media de CCT fue de: día 1, $1782.50 \pm 216.22 \mu\text{m}$; día 7, $1465.75 \pm 118.09 \mu\text{m}$; día 14, $1066.75 \pm 206.98 \mu\text{m}$; día 21, $1005.25 \pm 78.04 \mu\text{m}$, y día 28, $1010.75 \pm 87.03 \mu\text{m}$.

El análisis cuantitativo reveló que los valores del ECC incrementaron significativamente en comparación con el día pre-operatorio. A su vez, en los días post-operatorios, el ECC al día 1 y 7 fueron significativamente mayores en comparación con el ECC de los días 14, 21 y 28 ($p < 0.0001$) (Fig 54B).



*Figura 54. Cambios en el ECC en el los días pre- y post-operatorios. (A) Imágenes representativas de TCO que muestran un aumento del espesor en las córneas post-operadas a lo largo del estudio, y (B) análisis cuantitativo que demuestra que al final del estudio, las córneas con descemetorrexis incrementaron su espesor aproximadamente tres veces ($1010.75 \pm 87.03 \mu\text{m}$) en comparación con las córneas pre-operadas ($387.25 \pm 43.53 \mu\text{m}$). Se utilizó análisis de variación (ANOVA), * indica una diferencia significativa (valor $p < 0.0001$). Datos de $n=4$ animales. Abreviatura: ECC, espesor central corneal.*

4.3.3 Diámetro corneal

Durante el periodo de estudio, el diámetro corneal permaneció constante en los días del pre- y post-operatorio. La media del diámetro corneal en el día pre-operatorio fue de 13.97 ± 1.21 mm, comparado con la media de los días post-operatorios: día 1, 13.87 ± 1.42 mm; día 7, 13.41 ± 1.50 mm; día 14, 12.36 ± 0.79 mm; día 21, 12.12 ± 1.51 mm; y día 28, 13.21 ± 1.33 mm del post-operatorio. No se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de estudio (Fig 55)

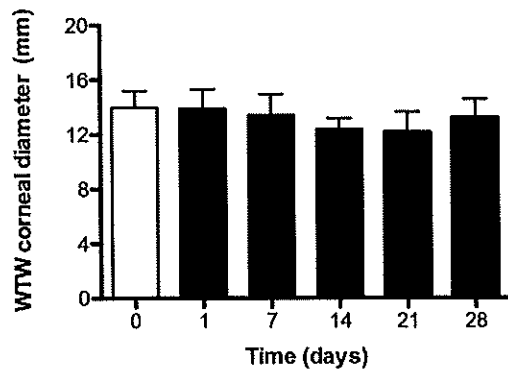


Figura 55. Mediciones del diámetro corneal en los días pre- y post-operatorios. El análisis cuantitativo del diámetro corneal demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo de estudio. Datos de n=4 animales.

4.3.4 Características morfológicas de las CEC

Las imágenes de microscopía especular mostraron que el EC central en el día preoperatorio aparece como una monocapa de CEC homogéneas en tamaño y con una morfología característica en panal de abeja (Fig 56A); después de la descemetorrexis quirúrgica, la imagen característica del EC no se detectó a lo largo del estudio, en su lugar se observó una superficie irregular correspondiente al estroma denudado (Fig 56B).

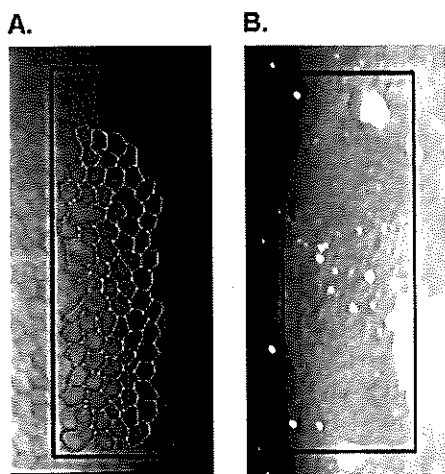
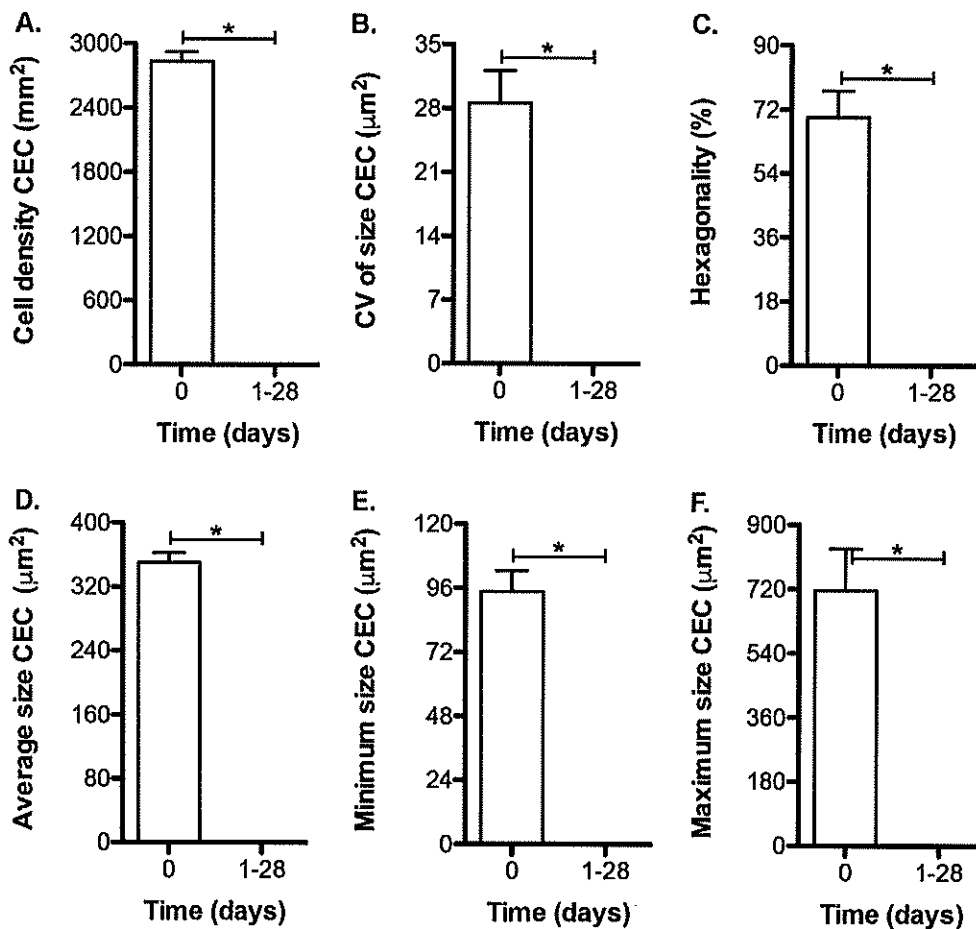


Figura 56. Aspecto morfológico de las CEC en el EC central en los días pre- y post-operatorio. Imágenes representativas (A) de las CEC en el EC central en el día pre-

operatorio e (B) imagen del estroma desnudo tras descemetorrexis en los días post-operatorios. Datos de n=4 animales.

En la evaluación pre-operatoria la densidad celular, CV del tamaño y el porcentaje de hexagonalidad fue de: 2834 ± 93.38 CEC/mm² (Fig 57A), 28.57 ± 93.38 μ m (Fig 57B), y 69.75 ± 14.99 % (Fig 57C), respectivamente. En relación con el tamaño promedio de las CEC fue de 350.05 ± 12.46 μ m (Fig 57D), con un tamaño mínimo de 94.66 ± 7.79 μ m (Fig 57E) y un tamaño máximo de 715.95 ± 116.98 μ m (Fig 57F). En contraste, en los días post-operatorios no se detectaron CEC en el centro de la córnea, este hallazgo se mantuvo a lo largo del periodo de estudio. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Fig 57).



*Figura 57. Análisis cuantitativo de las características de las CEC en el EC central en los días pre- y post-operatorio. Diferencias estadísticamente significativas en (A) densidad celular, (B) CV del tamaño, (C) morfología hexagonal, (D) tamaño promedio, (E) tamaño mínimo, y (F) tamaño máximo de las CEC en los días post-operatorios en comparación con el día pre-operatorio. Se utilizó análisis de variación (ANOVA), * indica una diferencia significativa (valor $p < 0.0001$). Datos de $n=4$ animales. Abreviatura: CV, coeficiente de variación; CEC, células endoteliales corneales.*

4.3.5 Análisis histológico

El análisis histológico de una córnea normal mediante tinción con H&E mostró un tejido organizado (Fig 58A), con un epitelio estratificado de 4-5 capas de células sin evidencia de anormalidades; un estroma compacto formado por lamelas paralelas con un área de separación media de $45.48 \pm 6.96 \mu\text{m}^2$, queratocitos de forma regular y compacta incluidos entre las lamelas, sin evidencia de formación de tejido fibroso; a su vez, en la parte más interna de la córnea se observó el endotelio corneal formado por una monocapa de CEC sobre la MD (Fig 58B). En contraste, las córneas post-operadas al día 28 se observaron como un tejido edematoso con pérdida de la citoarquitectura (Fig 58C). En su epitelio se observó la presencia de microquistes y bullas; mientras el estroma mostró cambios patológicos que involucran un incremento del espacio entre lamelas con un área de separación de $519.73 \pm 90.88 \mu\text{m}^2$, los queratocitos aparecen heterogéneos en forma y alargados en tamaño; en la parte más interna de la córnea, se observó la formación de tejido fibroso con una media de espesor de $423.98 \pm 152.85 \mu\text{m}$ con células alargadas y aspecto fibroblástico, junto con una evidente ausencia del endotelio cornea (Fig 58D).

El análisis estadístico demostró que después de la descemetorrexis quirúrgica, hubo una diferencia significativa en el incremento en la separación de las lamelas estromales (Fig 13E) y la formación de tejido fibroso (Fig 58F) en comparación con una córnea normal ($p < 0.05$).

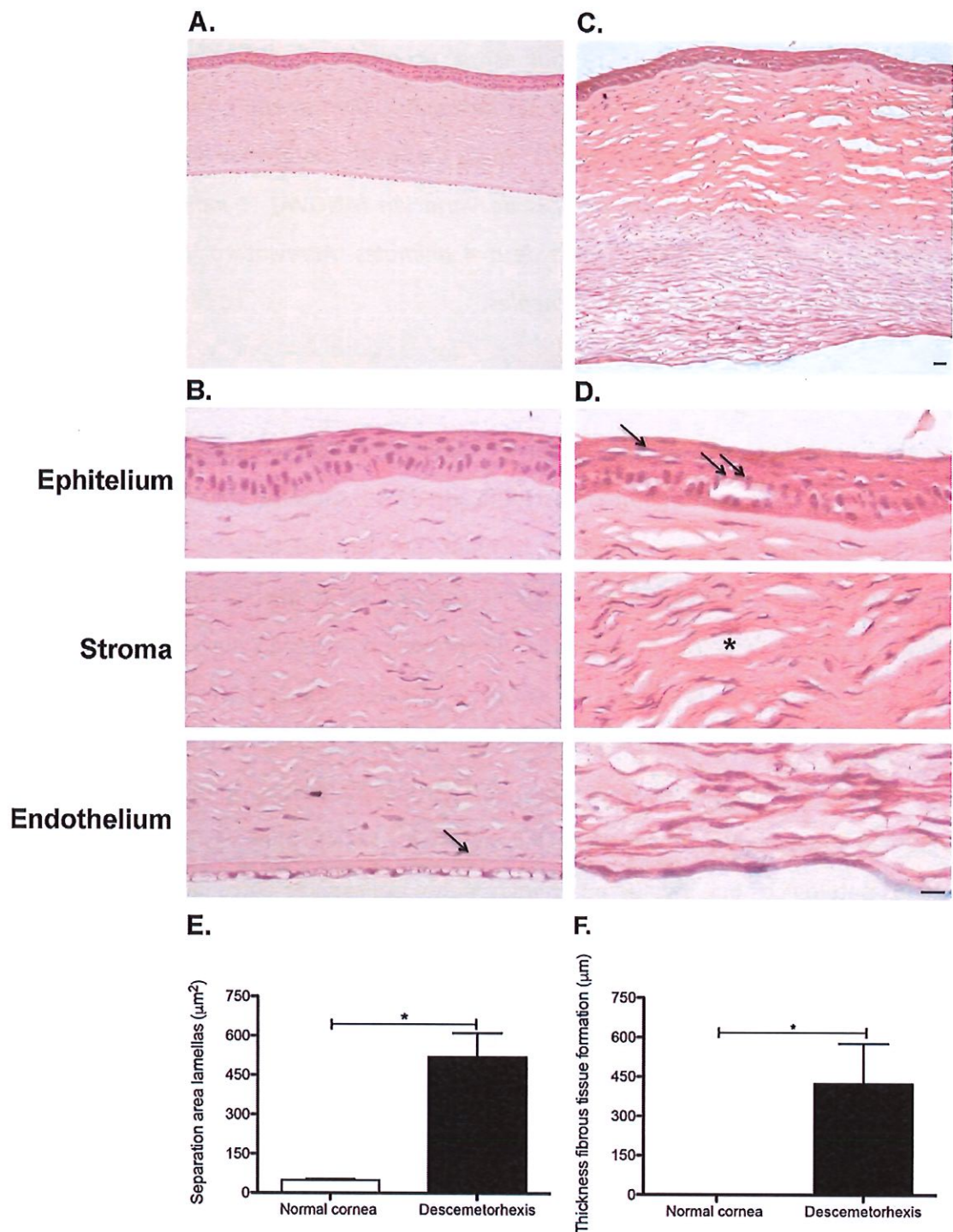


Figura 58. Hallazgos histopatológicos en una córnea normal y al día 28 del post-operatorio. Imágenes representativas de las características histopatológicas observadas con H&E en (A) córnea normal, formada por (B) un epitelio estratificado, un estroma

*compacto con queratocitos compactos y un endotelio formado por una monocapa de CEC sobre la MD (flecha). En contraste, en la córnea post-operada se observó un epitelio con presencia de microquistes (flecha) y bullas (doble flecha); un estroma con marcada separación de las lamelas (asterisco), con queratocitos irregulares, formación de tejido fibroso con células de aspecto fibroblástico y ausencia del endotelio. Escala, 50 μ m. El análisis cuantitativo del (E) área de separación de las lamelas estromales y (F) espesor del tejido fibroso formado demostró una diferencia estadísticamente significativa en el día 28 del post-operatorio en comparación con una córnea normal. Se utilizó análisis de Mann Whitney, * indica una diferencia significativa (valor $p < 0.05$). Datos de $n=4$ animales.*

4.4 Discusión

El ojo del conejo por sus características anatómicas se ha convertido en una herramienta muy valiosa para la investigación en oftalmología, siendo comúnmente utilizado como un modelo animal para el trasplante de SEC al permitir la reproducción de técnicas como la DMEK [69,148,166]. Sin embargo, un modelo animal ideal de QB en conejos debe cumplir con las siguientes condiciones: i) imitar la patología en humanos, ii) involucrar una técnica sencilla para su desarrollo, y iii) ser reproducible y estable. Para este propósito hemos desarrollado un modelo pre-clínico de insuficiencia endotelial corneal mediante descemetorrexis quirúrgica bajo burbuja de aire para reproducir las principales características de la QB en humanos.

Después del procedimiento quirúrgico, se observó una opacidad corneal, que se asoció con el incremento del ECC evidenciado en el estudio por TCO. Estos resultados coinciden con otros estudios que realizan un procedimiento de descemetorrexis corneal central [167,168], corroborándose así el principio de que la insuficiencia endotelial es causa de edema estromal y pérdida de la transparencia corneal [22,23]. En el día 1 del post-operatorio, se observó un incremento en el grado de opacidad corneal y los valores del ECC, seguido de una disminución en el día 7, el cual permaneció constante desde el día 14 hasta el final del post-operatorio. Este resultado puede ser explicado por el edema post-operatorio causado por la descompensación global del EC después de un procedimiento

quirúrgico [169], y por la actividad de las CEC periféricas al área de descemetorrexis central.

Es de resaltar, que no se observaron alteraciones del diámetro corneal, al parecer el estado edematoso de la córnea en el post-operatorio no compromete las dimensiones corneales. Este hallazgo es consistente con la literatura que indica que la insuficiencia endotelial en las distrofías corneales no incrementa los diámetros corneales [170].

Posterior al procedimiento quirúrgico y durante el seguimiento del estudio no se observaron CEC en el centro de la córnea; este hallazgo contrasta con reportes previos que han demostrado la capacidad de las CEC del conejo para formar una monocapa con morfología normal en 10 días después de una lesión con criogenia, y que es capaz de regresar el espesor corneal normal en un periodo de 30 días. Una posible explicación de esto puede estar asociada a la persistencia de la MD en los modelos por criogenia, que promueve la migración de las CEC no lesionadas, la repoblación de la MD y la recuperación de la función [171].

La descompensación del EC está asociada con anormalidades en el epitelio que incluyen: microquistes intraepiteliales, bullas sub-epiteliales y una pérdida completa del epitelio en estadios avanzados de la enfermedad endotelial [172,173] [33]. Nuestros hallazgos histopatológicos mostraron la presencia de microquistes y bullas en el epitelio corneal de las córneas post-operadas. Este resultado coincide con Bron y colaboradores, quienes reportan en su trabajo que pequeñas lesiones como microquistes pueden coalescer para formar una bulla, observándose como una mayor separación de las capas epiteliales [174]; en ocasiones ciertas bullas pueden permanecer ocultas en las capas del epitelio [175], lo que podría explicar nuestro hallazgo de tinción negativa con fluoresceína aun con evidencia de bullas en el análisis con H&E de las córneas post-operadas al final del estudio. Otra característica histopatológica encontrada en nuestro estudio fue la presencia de tejido fibrótico en la parte más interna de la córnea, este resultado puede ser explicado por la transformación de los queratocitos a sus formas activadas (fibroblastos o miofibroblastos) tras una lesión corneal [176], las cuales tienen capacidad para migrar y secretar una matriz extracelular en la zona de lesión [177,178]. Estos resultados coinciden

con otras investigaciones donde se ha reportado que en pacientes con QB, el edema corneal está acompañado por un mecanismo de trans-diferenciación de los queratocitos a mio-fibroblastos [176], los cuales proliferan y migran al área lesionada para forman una red interconectada de células que secretan numerosas proteínas de matriz extracelular que contribuyen a la formación de tejido fibroso [179].

Ha sido descrito que el daño corneal induce la liberación de diferentes factores de crecimiento como son: el factor activador de plaquetas, un potente inductor de vascularización corneal; el cual en presencia de miofibroblastos favorece la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular [180], otro importante factor pro-angiogénico en córnea [181]. Este mecanismo se encuentra en consistencia con Zhu y colaboradores, quienes han reportado procesos de vascularización en un modelo pre-clínico en monos Rhesus a los 30 días de generar una insuficiencia endotelial mediante una descemetorrexia por lesión química y mecánica [167]. A su vez, en pacientes con QB, Ishino y colaboradores han descrito esta alteración como parte de la enfermedad en sus estadios avanzados. Lo anterior podría explicar la vascularización observada en una de las córneas post-operadas, es de resaltar que esta córnea presentó un mayor grado de opacidad y una mayor formación de tejido fibrótico en comparación con las córneas post-operadas que no desarrollaron vascularizaciones (datos no mostrados).

A pesar, de que las limitaciones de este estudio estuvieron asociadas a ciertas características del ojo del conejo, como un cámara anterior reducida por un cristalino prominente y una poca cantidad de humor acuoso [182]; nuestros resultados demuestran que la descemetorrexia bajo burbuja de aire es una alternativa segura para remover el EC nativo sin comprometer otras estructuras oculares.

4.5 Conclusión

La descemetorrexis quirúrgica bajo burbuja de aire utilizando una espátula endotelial elaborada a mano, es un método efectivo, reproducible y estable para el desarrollo de insuficiencia endotelial caracterizada por: opacidad corneal persistente se asocia con un incremento del espesor corneal, sin evidencia de una respuesta regenerativa, ni alteración del diámetro corneal. Los cambios histopatológicos involucraron: desarrollo de microquistes y bulas en el epitelio, distorsión de las lamelas estromales por edema y formación de tejido fibrótico en la parte más interna de la córnea. Tanto los hallazgos clínicos como los histopatológicos observados en nuestro estudio reproducen las principales características de la QB en los humanos, haciéndolo un modelo pre-clínico adecuado para la evaluación de estrategias basadas en el trasplante de SEC.

5

Trasplante del ECA mediante
técnica DMEK en un modelo
animal de insuficiencia
endotelial.

5.1 Introducción

En la actualidad el único tratamiento disponible para remplazo de las CEC dañadas es el trasplante corneal. Desde que Melles y colaboradores desarrollaron la técnica DMEK [183] para el tratamiento de enfermedades del endotelio corneal, se ha convertido en el procedimiento de elección para reemplazar solo el endotelio dañado, en lugar de todas las capas de la córnea. En el año 2013 fue el procedimiento más común tanto en EUA como en la UE, con 1,522 y 1,491 casos respectivamente [184]. Es un procedimiento complejo que requiere una preparación del endotelio donante antes de su trasplante (Fig 59) [48].

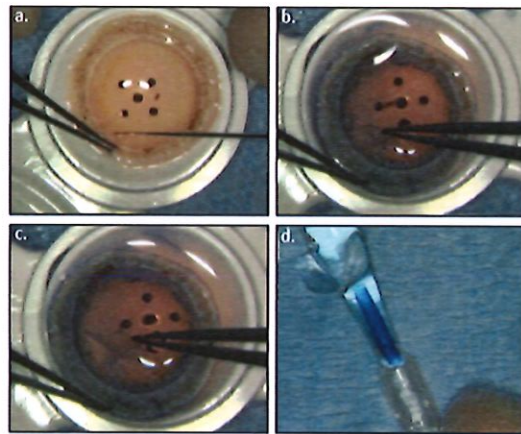


Figura 59. Técnica de preparación del endotelio corneal previo al trasplante mediante la técnica de DMEK. (a) Localización del borde endotelial, (b-c) separación del endotelio corneal del estroma subyacente, (d) endotelio corneal dentro de un inyector endotelial. Figura adaptada de [185].

Después de la obtención y preparación, el endotelio corneal del donante a manera de taco es inyectado dentro del segmento anterior luego de la remoción del endotelio nativo. El injerto debe luego ser desenrollado y mediante manipulación neumática o mediante fluidos el endotelio trasplantado debe oponerse sobre el estroma posterior ayudado de una burbuja de aire (Fig 60).

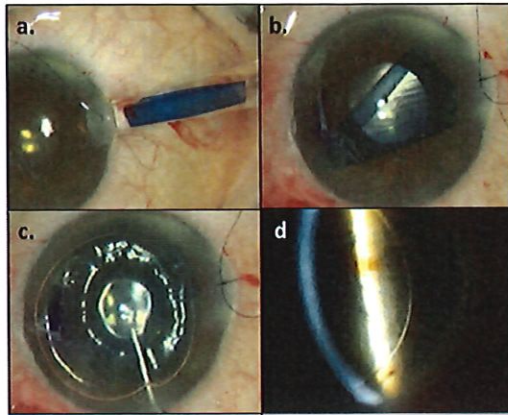


Figura 60. *Trasplante del endotelio corneal mediante técnica de DMEK. (a) Inserción del endotelio donante por medio de inyector a la cámara anterior, (b) disposición en doble rollo del endotelio dentro de la cámara anterior, (c) burbuja de aire por debajo del endotelio trasplantado para favorecer la adhesión al estroma receptor, (d) borde del endotelio corneal trasplantado adherido al estroma receptor visto mediante lámpara de hendidura. Figura adaptada de [185].*

Distintas ventajas en estas técnicas como la posibilidad de eliminar la necesidad de suturas, el menor tiempo de recuperación visual y menor posibilidad de rechazo inmunológico llevaron a la queratoplastia endotelial a convertirse en el procedimiento quirúrgico más común [186] [187].

La posibilidad de trasplantar una monocapa celular mediante esta técnica, adición de una nueva herramienta para probar los sustitutos de endotelio corneal obtenidos mediante las estrategias de ingeniería de tejidos. Lo cual ha permitido el trasplante de estos sustitutos en modelos de insuficiencia endotelial. En este capítulo se evalúan el curso y los cambios asociados tras el trasplante del ECAC mediante técnica DMEK en un modelo animal de queratopatía bullosa.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Donantes

Dos conejos blancos de Nueva Zelanda fueron utilizados como donantes de cristalinos frescos para la obtención de la CAC con su epitelio, los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de una mezcla de hidrocloreuro de ketamine (5mg/kg, Ketafine, Argentina) e hidrocloreuro de xilacina (1mg/kg, Erma, Colombia) y eutanaciados por una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg, Penthal, Ecuador), administrado por vía intracardiaca. Ambos ojos fueron enucleados y colocados en cámaras húmedas hasta su procesamiento.

5.2.2 Preparación de la CAC

Luego de la enucleación, se realiza tallado del segmento anterior del ojo a partir de la realización de una incisión en esclera a 10 mm de la región limbar; se realiza aislamiento del cristalino mediante el corte de las fibras de la región zonular utilizando tijeras (MANI, Japón) y pinzas de microdissección (MANI, Japón).

La disección se realiza sin perder la orientación y ubicación de la CAC, que será orientada hacia arriba; para favorecer su visualización se realiza una tinción con azul de tripano durante 1 minuto, tras el cual se realiza lavado con solución BSS. Para protección de la CAC y evitar su enrollamiento se coloca una capa de viscoelástico sobre toda su superficie y se procede a su disección cortando por todo el ecuador del cristalino, una vez separada la CAC de la CP, se coloca una tirilla de silicón sobre la CAC cubierta con viscoleastico y se comienza a separar la CAC del cuerpo del cristalino y orienta sobre la tirilla de silicón, de manera que queda completamente envuelta por la CAC con el epitelio expuesto hacia afuera. Se toma el extremo externo de la tirilla de silicón y se levanta la CAC para su separación del cuerpo del cristalino. Una vez separado, se coloca en el inyector endotelial preparado previamente con un recubrimiento de viscoelástico, la tirilla de silicona con la CAC, se coloca dentro del inyector endotelial sin perder al orientación del epitelio en la

CAC, se cubre con viscoelástico y se deja preparado en inyector endotelial hasta su utilización.

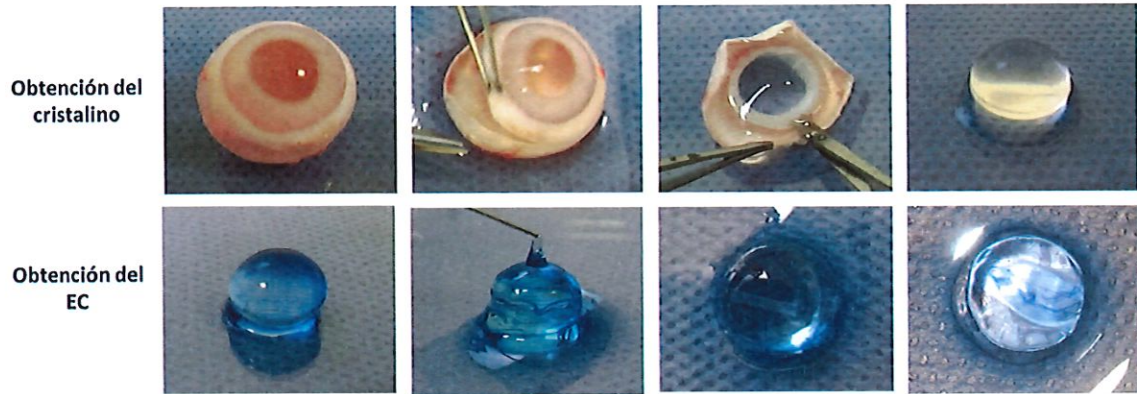


Fig 61. *Obtención del cristalino donante y preparación de la CAC (a) aspecto macroscópico del ojo tras enucleación, (b) tallado del segmento anterior del ojo para obtención del cristalino, (c) corte de las fibras de la región zonular para liberación del cristalino y (d) aspecto macroscópico del cristalino tras su aislamiento del resto de los tejidos oculares. (e) tinción con azul de tripano para mejorar la visualización de la cápsula del cristalino (flecha) , (f) corte en toda la periferia del cristalino para aislamiento de la CAC, (j) aplicación de una película de viscoelástico sobre la CAC aislada, (h) colocación de una tirilla de silicona (doble flecha) sobre la película de viscoelástico, y (i) envoltura de la tirilla de plástico con la CAC.*

5.2.3 Trasplante de la CAC en un modelo animal de insuficiencia endotelial

Cuatro conejos blanco de Nueva Zelanda fueron utilizados para realizar el trasplante de la CAC mediante cirugía de DMEK. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de una mezcla de 5mg/kg de hidrocloreuro de ketamine (Ketafine, Brouwer, Argentina) y 2 mg/kg de hidrocloreuro de xilacina 2% (Erma, Colombia). Previa realización del trasplante se realiza descemetorrexia quirúrgica utilizando la misma metodología planteada para el desarrollo del modelo pre-clínico de QB (Capítulo 4). Al terminar la descemetorrexia se continúa con la ampliación de la herida quirúrgica inicial hasta 5 mm utilizando un cuchillete angulado de 2.55 mm (MANI, Japón). Se inyecta viscoelástico

(Sophia, México) para ampliación de la cámara anterior y se introdujo el inyector endotelial con la CAC cargada en su interior, se dirige la punta hacia la región central y se procede a su inyección, una vez depositada la CAC dentro de cámara anterior se retira la laminilla de silicona y se procede a la extensión lo más posible de la CAC sobre el estroma denudado.

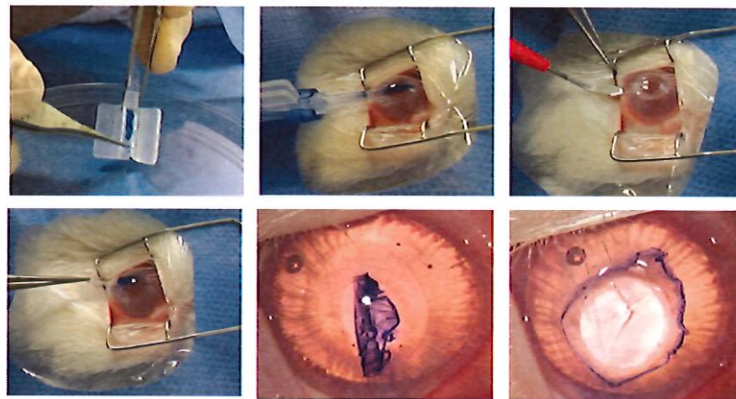


Fig 62. Trasplante de la CAC por medio de técnica DMEK. (A) colocación de la tirilla de silicona con la CAC en el inyector endotelial, (B) ampliación de la paracentesis para acceso a la cámara anterior, (C) inyección de la CAC en cámara anterior previa ampliación con viscoelástico, (D) extracción de la tirilla de silicona, (E) aspecto de la CAC envolviendo la tirilla de silicona tras ser colocada en cámara anterior, y (F) aspecto de la CAC luego de retirar la tirilla de silicona y extenderse sobre la superficie denudada del estroma receptor.

Se realiza lavado de la cámara anterior y se cierra la herida con puntos separados utilizando nylon 10-0, la incisión corneal fue hidratada y se dio por terminado el procedimiento quirúrgico. Una mezcla de 5mg/mL moxifluoxacino y 1mg/ml dexametazona (Tecnofar, Colombia) en solución oftálmica fueron colocados dos veces al día por 7 días; además timolol 0,5% (Arbofarma, Colombia) y pilocarpine 2% (ALCON, Colombia) en solución oftálmica fueron utilizados dos veces al día por 28 días.

5.2.4 Evaluación clínica pre- y post-operatoria

Cada ojo trasplantado fue examinado en los días del pre- (0) y post-operatorios (1,7,14, 21 y 28) por un operador experimentado para la evaluación de: i) transparencia corneal, ii) tinción epitelial, iii) espesor corneal central (ECC), y iv) diámetro corneal. Los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados obtenidos del modelo animal de queratopatía bullosa.

5.2.4.1 Transparencia corneal

Utilizando una lámpara de hendidura, la transparencia corneal y el segmento anterior del ojo fueron examinados y fotografiados bajo condiciones estándar (intensidad moderada, baja magnificación, con las luces ambientales apagadas). El filtro amarillo fue utilizado para: vista general con iluminación difusa y haz de luz circular, y ii) sección óptica de la córnea (3mm ancho, 14 de largo, ángulo de 90°) con iluminación directa. El grado de opacidad corneal fue determinado por dos observadores independientes y enmascarados, de acuerdo a la siguiente escala: grado 0, cornea completamente transparente; grado 1, opacidad corneal que permite la visualización de detalles finos del iris; grado 2, opacidad corneal prominente que interfiere con la visibilidad de los detalles finos del iris.

5.2.4.2 Tinción epitelial corneal

El epitelio corneal fue examinado después de la instilación de una gota de fluoresceína al 2% dentro de la parte central del párpado inferior, con la lámpara de hendidura bajo condiciones estándar y utilizando el filtro azul para una vista general con iluminación difusa y haz de luz circular; fotografías de cada cornea fueron tomadas. El grado de tinción epitelial fue determinado por dos observadores enmascarados de acuerdo a la siguiente escala: grado 0, no tinción; grado 1, tinción punteada; grado 2, tinción en menos del 50% de la córnea y grado 3, tinción en más del 50% de la córnea.

5.2.4.3 ECC

Se utilizó tomografía de coherencia óptica (OCT) para determinar el ECC. Se realizó una medición horizontal y una vertical utilizando la pupila como referencia para el centro de la córnea. Las imágenes fueron capturadas utilizando el modo automático del equipo y el valor del ECC fue medido manualmente en una sección óptica de la córnea y expresado en μm .

5.2.4.4 Diámetro corneal

El diámetro corneal horizontal fue medido con biómetro corneal. Tres mediciones consecutivas fueron tomadas de cada ojo para determinar el diámetro corneal y expresado en mm.

5.2.4.5 Análisis histológico

Al día 28, todos los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de una mezcla de hidrocloreto de ketamina (5mg/kg, Ketamine, Argentina) e hidroxidrocloreto de xilacina (1mg/kg, Xilacina, Colombia) y eutanaciados por una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg, Pentobarbital, Ecuador), administrado por vía intracardiaca. Ambos ojos fueron enucleados, las corneas fueron talladas, fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina; secciones de 5 μm fueron cortadas con criostato y teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). La cornea izquierda fue utilizada como control normal.

El tejido corneal fue histológicamente evaluado por un patólogo calificado para estimar la presencia de: i) defectos epiteliales, ii) celularidad estromal (infiltración), iii) fibrosis, y iv) neovascularizaciones. Los cambios patológicos fueron establecidos en grados, del 0 al 2, basados en la severidad de cada característica. Para defectos epiteliales, grado 0: ninguno; grado 1, microquistes; grado 2, burbujas; para celularidad estromal, grado 0: 0-15, grado 1: 15-30, grado 2: >30 núcleos celulares por campo visual; para fibrosis: grado 0: no fibrosis, grado 1: fibrosis <50% del espesor corneal, grado 2: fibrosis >50% del espesor total del estroma; y neovascularización: grado 0: ninguno, grado 1: 1-3 neo-vasos, grado 2: más de 3 neo-vasos.

Todas las laminillas fueron examinadas utilizando un microscopio de contraste de fase (Leica, Wentzler, Alemania), las fotografías fueron tomadas con una cámara EC3 adaptada al microscopio (Leica). Los puntajes de cada característica fueron sometidos a análisis estadístico.

5.3 Resultados

5.3.1 Transparencia cornea

En la evaluación preoperatoria de las corneas con descemetorrexis mecánica y las trasplantadas, la exploración mediante lámpara de hendidura revela corneas completamente claras que permiten la visualización de los detalles finos del iris en la vista general (grade 0), (Fig 63A), y una imagen corneal curvilínea y compacta rodeando la cámara anterior en la sección óptica de la córnea (Fig 63b).

En el post-operatorio hasta el día 28, en las corneas de ambos grupos la exploración en la vista general revela una opacidad corneal central que interfiere con la visibilidad de los detalles finos del iris (grado 2). En la sección óptica se observa edema estromal y una cámara anterior formada. En la tinción del epitelio, no se observa marcaje positivo en las corneas de ambos grupos en el pre- y post-operatorio.

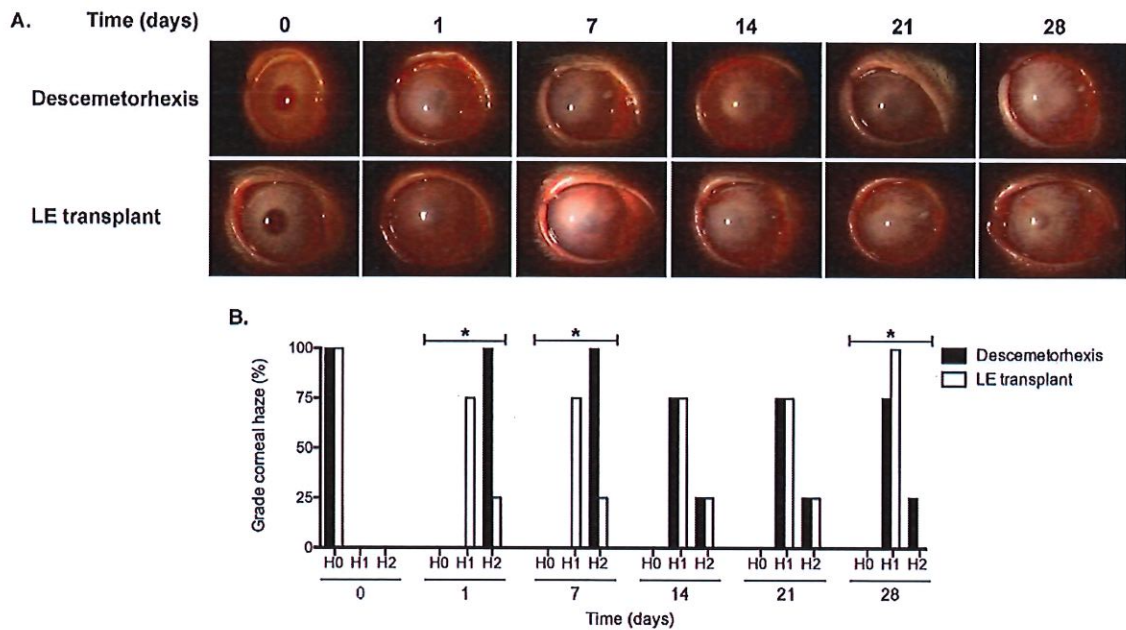


Figura 63. Vista general del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-trasplante del EC. (A) Imágenes representativas con lámpara de hendidura tras realizar descemetorrexia quirúrgica o trasplante de EC. En el día pre-operatorio, las córneas se observaron completamente claras (grado H0). En los días post-operatorios 1 y 7 se observó que las córneas con solo descemetorrexia presentaron opacidad corneal (grado H2), sin embargo a partir del día 14 hasta el final del estudio, se observó una reducción en este grado hasta llegar a H1. En contraste, las córneas trasplantadas presentaron menor opacidad corneal en todos los días post-operatorios (grado H1). (B) El análisis cuantitativo demostró una diferencia significativa menor en el grado de opacidad corneal entre las córneas trasplantadas en comparación con las de solo descemetorrexia en los días 1, 7 y 28. Se utilizó Test de Pearson, donde * indica una diferencia significativa $p < 0.0001$. Datos de $n=4$ animales por grupo experimental. Abreviaturas: LE transplant: trasplante EC.

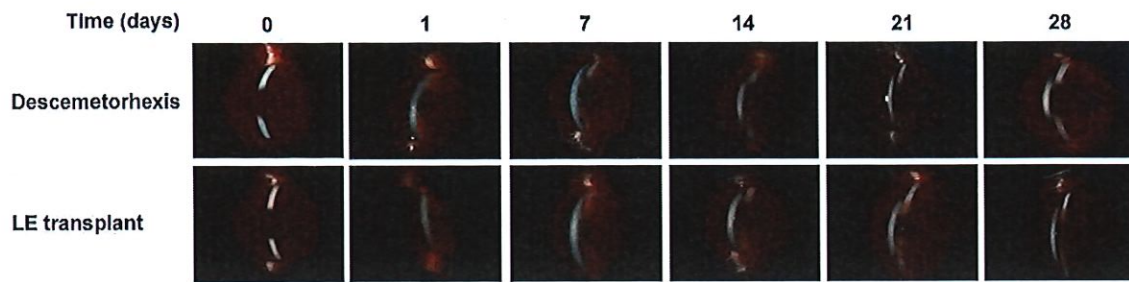


Figura 64. Sección óptica del segmento anterior del ojo en los días pre- y post-trasplante del EC. Imágenes representativas con lámpara de hendidura tras descemetorhexis quirúrgica o trasplante de EC. En el día pre-operatorio, se observó una córnea curvilínea y delgada, mientras que en los días post-operatorios se observó una córnea edematizada a nivel del estroma. Datos de n=4 animales por grupo experimental. Abreviaturas: LE transplant: trasplante EC.

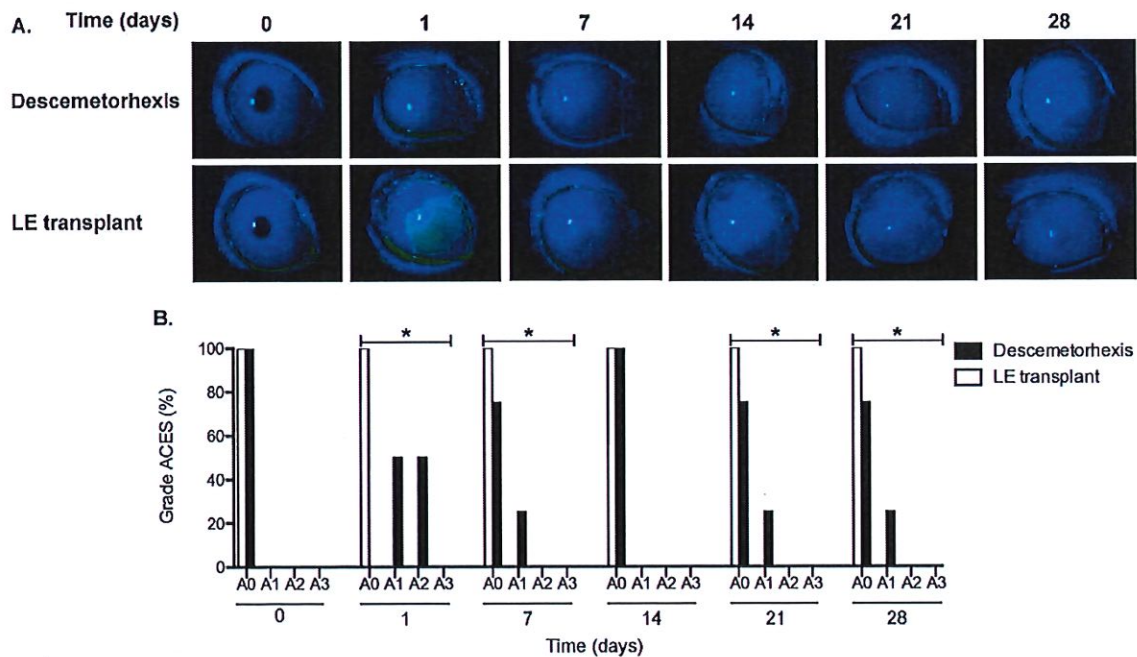


Figura 65. Área de tinción epitelial corneal en los días pre- y post-trasplante del EC. Imágenes representativas con lámpara de hendidura tras la instilación de fluoresceína, (A) en el día pre-operatorio, no se observó tinción epitelial (grado A0), mientras que en los días post-operatorios 1,

7, 21 y 28 en las córneas con solo descemetorrexis se observó tinción epitelial positiva (grado A1-A2), a diferencia de las córneas trasplantadas que fueron ausentes de tinción epitelial (A0). (B) El análisis cuantitativo demostró diferencias significativas en el grado de tinción epitelial, entre las córneas trasplantadas con CE y aquellas que tuvieron solo descemetorrexis. Se utilizó Test de Pearson, donde * indica una diferencia significativa $p < 0.0001$. Datos de $n=4$ animales por grupo experimental. Abreviatura: ACES, área de tinción epitelial corneal.

5.3.2 ECC

Resultados de la OCT en el pre-operatorio muestran una cornea compacta y delgada, en los días del post-operatorio en las corneas sometidas a solo descemetorrexis y las postrasplantadas triplicaban y doblaban, respectivamente, el valor del ECC en comparación con las corneas normales. La diferencia entre el ECC de las corneas con descemetorrexis y las trasplantadas hasta el día 14 fueron no estadísticamente significativas, al final del estudio las corneas trasplantadas mostraban una tendencia a disminuir el ECC. (Fig 66)

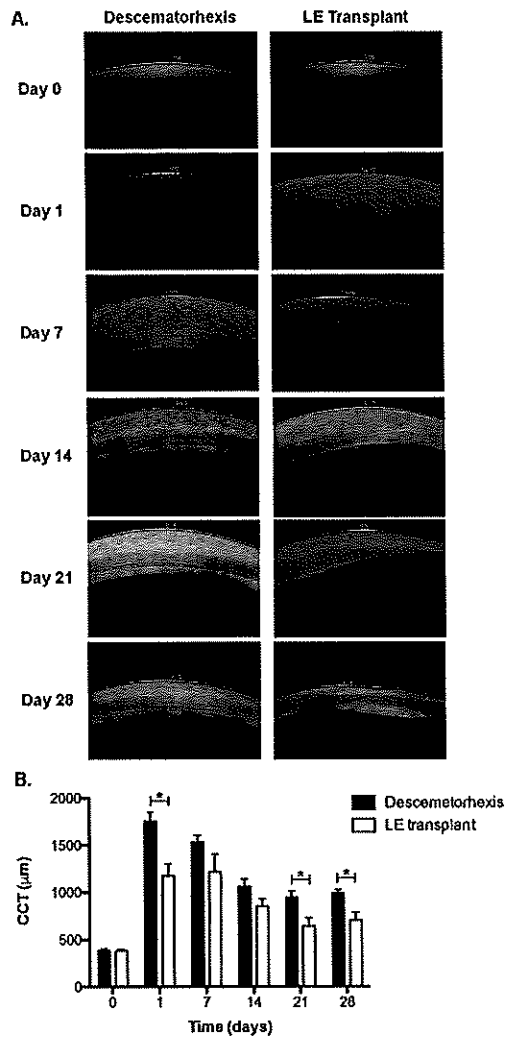


Figura 66. Cambios de ECC en los días pre- y post-trasplante del EC. (A) Imágenes representativas del ECC de córneas con solo descemetorhexis y trasplantadas en el día pre- y post-operatorios. (B) Análisis cuantitativo que muestra una diferencia significativa en el ECC entre las córneas con solo descemetorhexis y las trasplantadas en los días 1, 21 y 28. Análisis de variación (ANOVA) fue utilizado, * indica una diferencia significativa $p < 0.0001$. Datos de $n=4$ animales por grupo experimental. Abreviatura: CCT, espesor central corneal.

5.3.3 Diámetro corneal

Durante el periodo de estudio, el diámetro corneal se mantuvo constante en los días del pre- y post-operatorio. No existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Fig 67).

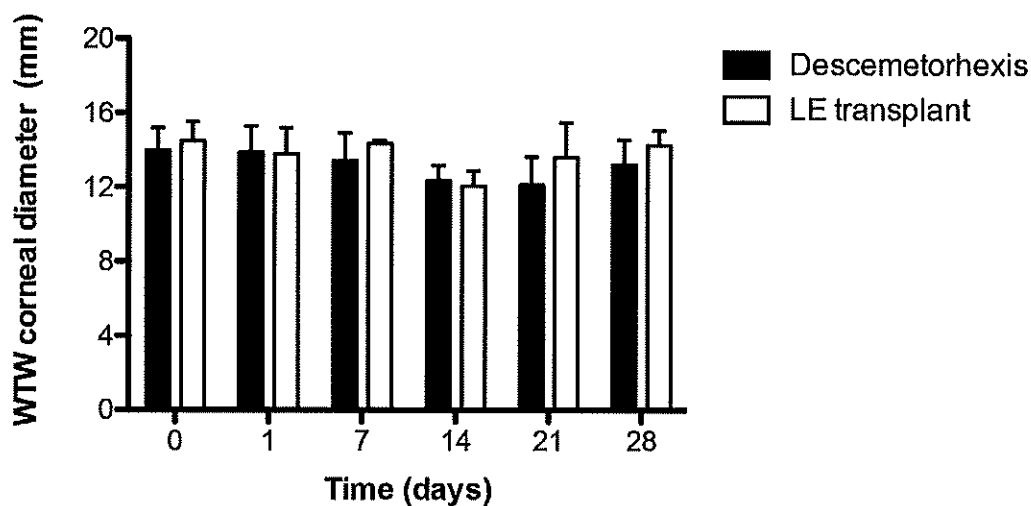


Figura 67. Análisis cuantitativo del diámetro corneal en los días pre- y post-trasplante del EC. No se observaron diferencias significativas al comparar el diámetro de las córneas con solo descemetorrexix y trasplantadas durante el estudio. Datos de n= 4 animales por grupo experimental.

5.3.4 Análisis histológico

En las corneas control, el análisis histopatológico con H&E muestra un epitelio estratificado compuesto por 5 capas celulares, sin evidencias de defectos epiteliales (grado 0), no es posible observar membrana de Bowman. El estroma aparece organizado por lamelas, con una celularidad (grado 0) correspondientes a la presencia de queratocitos incluidos en el arreglo de colágeno; no se observan datos de fibrosis (grado 0) o de neovascularización (grado 0). En la parte más interna de la córnea aparecen las CEC formando una monocapa sobre la MD.

En las corneas con descemetorrexix se evidencia la presencia de lesiones epiteliales con apariencia de bulas (grado 2). El estroma muestra cambios patológicos que involucran un evidente incremento del espacio entre las lamelas estromales por el edema, hiperproliferación de queratocitos (grado 2) con aspecto fibroblástico incluidos en una

matriz extracelular desorganizada de aspecto fibrotico que ocupa la mitad interna de la córnea (grado 2). Adicionalmente, procesos de neo vascularización fueron encontrados en la superficie del estroma (grado 2), en la parte más interna de la córnea es evidente la ausencia de la MD con las CEC.

En contraste, las corneas post-trasplantadas muestran un epitelio sin alteraciones (grado 1). El estroma muestra cambio asociados con edema, sin evidenciarse proliferación de los queratocitos o alteraciones de la morfología. Se observa depósito de matriz extracelular en menos del 10% del espesor de la cornea (grado 1). En la parte más interna de la córnea se evidencia la presencia de la CAC con el EC orientadas hacia la cámara anterior del ojo, resaltando los siguientes hallazgos:

- i) la CAC presenta aposición e integración al estroma receptor
- ii) Falta de adherencia de la CAC en algunas corneas en la periferia del trasplante y observado en dos presentaciones, como una lámina o como un enrollamiento.
- iii) Presencia de MD en aposición con la CAC trasplantada.
- iv) Remanentes de la MD nativa por incompleta remoción de la cámara anterior
- v) Depósito de tejido fibrotico en las áreas de mala aposición de la CAC.

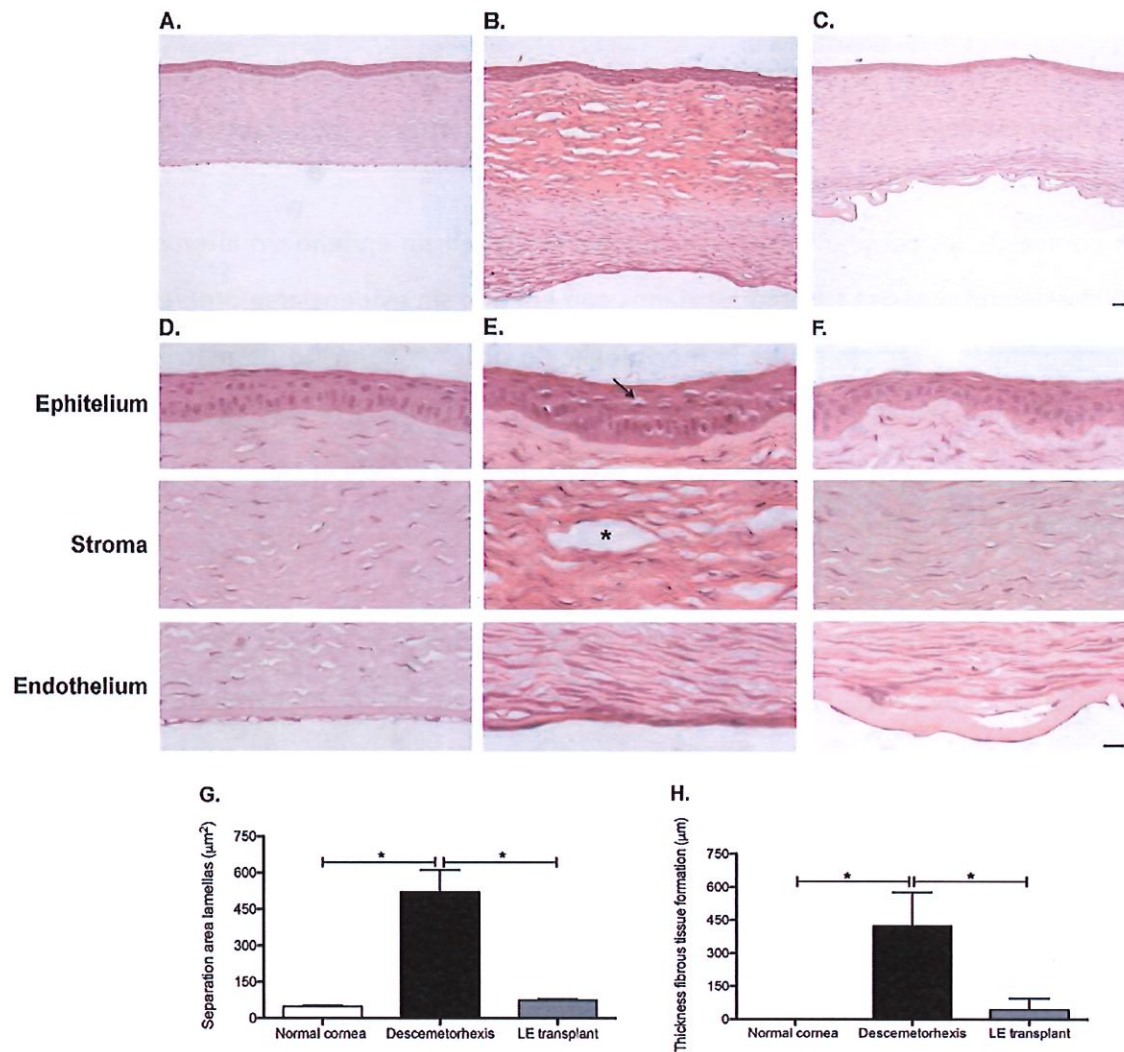


Figura 68. Análisis histopatológico post-trasplante del EC con las células epiteliales orientadas hacia la cámara anterior del ojo. Imágenes representativas de las características histopatológicas mediante tinción con H&E de: (A) córnea normal, (B) córnea con solo descemetorrexis y (C) córnea trasplantada con EC. (D) La córnea normal presentó un tejido organizado formado por: i) un epitelio estratificado y compacto formado por 5 capas celulares epiteliales, ii) estroma compuesto por lamelas paralelas con mínima separación y queratocitos incluidos entre ellas y iii) la MD con las CEC en la porción interna de la córnea. (E) La córnea con solo descemetorrexis se observó como un tejido edematoso, compuesto por: i) un epitelio con presencia de defectos epiteliales (microquistes y bullas), ii) un estroma con separación importante de las lamellas que

*incluyen queratocitos de aspecto irregular; y iii) presencia de tejido fibroso con células de aspecto fibroblástico en la parte interna de la córnea, donde es evidente la ausencia de la MD con las CEC. (F) La córnea trasplantada, presentó: i) un epitelio estratificado sin presencia de lesiones epiteliales, ii) un estroma compacto con mínima separación de las lamelas, queratocitos de aspecto alargado y mínima formación de tejido fibroso y iii) en la parte interna de la córnea se observó la incompleta aposición del EC en el estroma receptor. El análisis cuantitativo evidenció una diferencia significativa al comparar (G) la separación de las lamelas estromales y (H) el espesor del tejido fibrótico entre las córnea normales y las trasplantadas en comparación con la córneas con solo descemetorrexis. Análisis de variación (ANOVA) fue utilizado, * indica una diferencia significativa $p < 0.0001$. Datos de $n=4$ animales por grupo experimental.*

5.4 Discusión

El trasplante del EC en un modelo animal de insuficiencia endotelial mantuvo un grado constante de opacidad (H1) a lo largo del estudio, siendo capaz de evitar el edema corneal post-operatorio, observado como un mayor grado de opacidad (grado H2) en los primeros 7 días en las corneas de solo descemetorrexis. En modelos pre-clínicos, el trasplante por DMEK de SEC elaborados a partir del cultivo de las CEC son capaces de evitar el edema corneal post-operatorio y reducir el grado de opacidad corneal hasta su aclaramiento desde el día 14 [69,148] hasta 6 meses [188] del post-operatorio.

Después del trasplante, se observó el desarrollo de vascularizaciones corneales periféricas pero que no progresaban a la zona trasplantada. El desarrollo de vascularizaciones después de una queratoplastia es una condición que puede asociarse a un rechazo del tejido trasplantado, sin embargo el trasplante por medio de la técnica DMEK permiten el mantenimiento del privilegio inmune de la córnea [189], haciendo poco frecuentes estas reacciones. Además, Seigel y colaboradores han reportado que bajo condiciones adecuadas las células del EC, no son células inmunogénicas [190].

Dua y colaboradores han descrito que los signos clínicos de rechazo de tejido post-trasplante incluyen: inyección limbar, células en el humor acuoso, reacción inmune en el sitio del trasplante (línea de Khodadoust), infiltrados epiteliales, vascularizaciones estromales que se dirigen al centro de la córnea, y edema estromal [191]. En nuestro estudio del espectro de alteraciones ante un rechazo de tejido trasplantado solo encontramos el desarrollo de vascularizaciones pero con la particularidad de que limitaron en la zona trasplantada, estos resultados se encuentran en contraste con los obtenidos por Khodadoust y Silverstein en los que al evaluaron las respuesta de rechazo ante trasplante del endotelio corneal en un modelo de conejo, observaron el desarrollo de vascularizaciones en el estroma edematoso desde la periferia extendiéndose más allá de la zona trasplantada [192]. Este resultado podría ser explicado por Seigel y colaboradores quienes han mencionado que en el cristalino, la capsula anterior se le han asociado la capacidad de inhibir la angiogénesis a partir de su composición característica de COL IV y endostatinas [190].

En cuanto al ECC se identificó que las corneas trasplantadas presentaron menor incremento en comparación con las corneas de solo descematorrexis, lo que se asocia con el menor grado de opacidad observado en el día 1 del post-operatorio. A lo largo del tiempo de estudio se observa una disminución del ECC en las corneas post-trasplantadas que es evidente a partir del día 21 al 28 del post-operatorio en comparación con las corneas de solo descematorrexis. En modelos animales trasplantados con SEC a partir de CEC, algunos estudios han demostrado que la reducción en el ECC es observada desde el día 1 hasta el día 28 [69,148], e incluso hasta 6 meses del trasplante [188], sin embargo nuestro estudio fue realizado solo por 28 días. Se ha descrito que el incremento en el ECC tras trasplante es una condición asociada a la disfunción del tejido trasplantado (rechazo inmune, inflamación, disminución de la densidad celular), mientras que una disminución del ECC es atribuido a una recuperación de los mecanismo encargados de la función de “bomba y barrera” [193].

Es de resaltar que no se observaron alteraciones en el diámetro corneal en las corneas trasplantadas y las de solo descemetorrexis, en consistencia con lo observado en patologías del endotelio corneal en los que no se modifica el diámetro corneal.

En el análisis histopatológico, nuestros hallazgos mostraron que las corneas trasplantadas son capaces de evitar la progresión de las alteraciones asociadas a la insuficiencia endotelial observadas en las corneas de solo descemetorrexis. Este resultado es muy similar al observado por Vázquez y colaboradores al trasplantar un SEC a partir de CEC es capaz de mantener una cornea trasplantada con características muy similares a una córnea normal [69,148].

En la cara interna de las corneas trasplantadas se observa mínima formación de tejido fibroso, posiblemente asociado a la aposición incompleta de la CAC, condición también observada cuando existe aposición incompleta en el trasplante por DMEK del endotelio corneal o SEC [11].

Otro hallazgo histopatológico, es la disposición de las células del EC como una monocapa de células aplanadas, posiblemente por el efecto mecánico de la presión intraocular. Kidd y colaboradores han reportado que las células del EC bajo ciertas condiciones de cultivo celular son capaces de crecer formando una monocapa que libera agregados esféricos denominados cuerpos lentoides [194], formados principalmente por cristallina. Sin embargo en nuestro estudio no observamos la formación de estos cuerpos, posiblemente asociado a la composición del humor acuoso que mantiene a la células del EC en estado quiescente. El análisis histopatológico muestra una citoarquitectura muy similar a la de una cornea normal, sin evidencia de infiltrados celulares y procesos de vascularización, en contraste con lo mencionado con Larking [195] quien en un modelo animal de conejo demostró que el rechazo de tejido corneal pos trasplante está caracterizado por infiltración celular con macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos e invasión de vasos sanguíneos, respectivamente.

El mantenimiento de la opacidad corneal en las corneas trasplantadas a pesar de la reducción en el espesor corneal y el mantenimiento de la citoarquitectura podría ser explicado por las siguientes suposiciones:

i) insuficiente actividad de los mecanismo implicados en el fenómeno de bomba y de barrera en el EC al ser trasplantado como un sustituto del endotelio corneal por una incompleta aposición de la CAC al estroma receptor y falta de adaptación de las células del EC a los 28 días trasplante, siendo necesario un tiempo mayor de adaptación a las nuevas condiciones intraoculares.

5.5 Conclusión

Un mejor entendimiento del trasplante por medio de la técnica DMEK, será guía para el refinamiento de las habilidades y la técnica quirúrgica utilizada para el trasplante de la CAC como sustituto del endotelio corneal y disminuir las tasas de fallas en el trasplante.

El trasplante del ECAC en un modelo animal demostró la posibilidad de trasplantar esta monocapa de manera similar a un EC, permitiendo adaptar una técnica quirúrgica ampliamente utilizada por los cirujanos oftalmólogos. A pesar de no lograrse la recuperación en la transparencia corneal, nuestros hallazgos histológicos mostraron que las corneas trasplantadas son capaces de evitar la progresión de las alteraciones asociadas a la insuficiencia endotelial.

6

Trabajo futuro. Trasplante del
ECAC con las células
orientadas hacia el estroma
receptor.

6.1 Introducción

En un ensayo piloto en el que se realizó trasplante del EC con las células orientadas hacia el estroma receptor se observó ausencia en la formación de vascularizaciones corneales; y en el análisis histopatológico se observó: (i) epitelio sin lesiones, (ii) estroma con mínima separación de lamelas, queratocitos compactos, sin depósito de tejido fibroso, (iii) en la parte más interna se observa una completa aposición de la CAC con las células orientadas hacia el estroma receptor, abriendo la posibilidad de ampliar el número del grupo experimental.

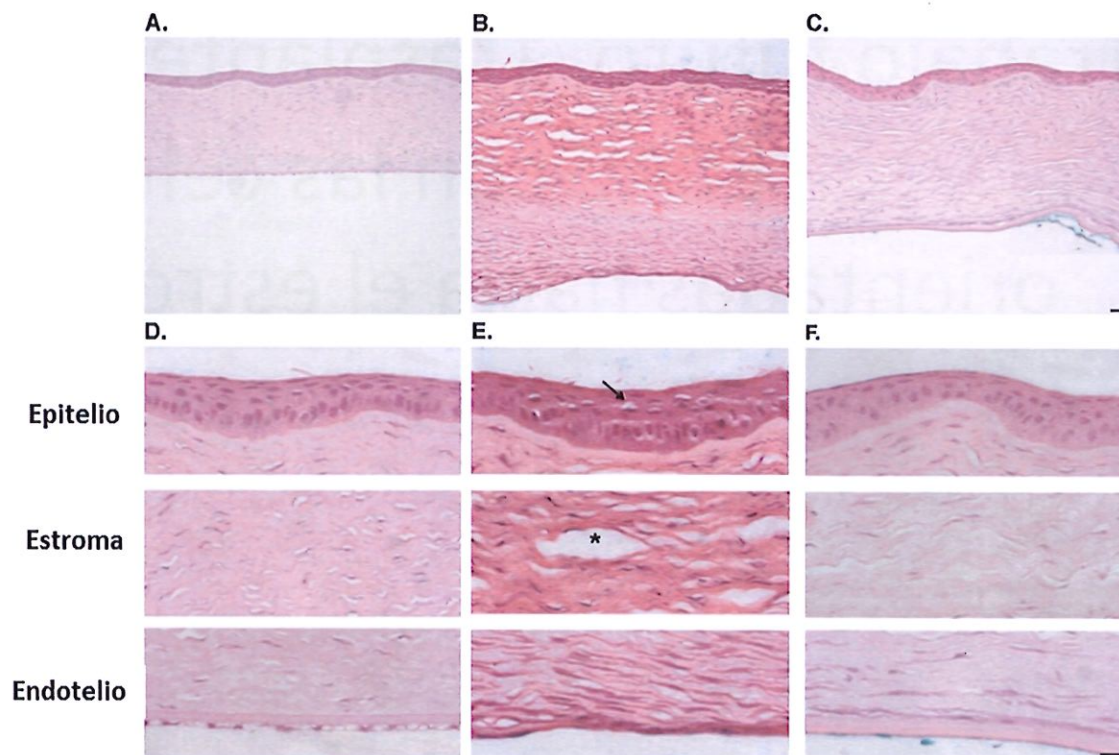


Figura 69. Análisis histopatológico post-trasplante del EC con las células epiteliales orientadas hacia el estroma receptor. Imágenes representativas de las características histopatológicas mediante tinción con H&E de: (A) córnea normal, (B) córnea con solo descemetorrexis y (C) córnea trasplantada con EC. (D) La córnea normal presentó un tejido organizado formado por: i) un epitelio estratificado y compacto con 4-5 capas celulares, ii) estroma compuesto por lamelas paralelas con mínima separación y

queratocitos incluidos entre ellas y iii) la MD con las CEC en la porción interna de la córnea. (E) La córnea con solo descemeterrexia se observó como un tejido edematoso, compuesto por: i) un epitelio con presencia de defectos epiteliales (microquistes y bullas), ii) un estroma con separación importante de las lamelas que incluyen queratocitos de aspecto irregular; y iii) presencia de tejido fibroso con células de aspecto fibroblástico en la parte interna de la córnea donde es evidente la ausencia de la MD con las CEC. (F) La córnea trasplantada, presentó: i) un epitelio estratificado sin presencia de lesiones epiteliales, ii) un estroma compacto con mínima separación de las lamelas, queratocitos de aspecto alargado sin formación de tejido fibroso y iii) en la parte interna de la córnea se observó la completa aposición del EC en el estroma receptor.

7

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El epitelio de la cápsula anterior del cristalino obtenida de donantes jóvenes de tejido ocular tiene una morfología y citoarquitectura similar al endotelio corneal.
2. El epitelio de la cápsula anterior del cristalino expresan los marcadores estructurales y funcionales del endotelio corneal asociados al mantenimiento de la transparencia corneal.
3. Se ha desarrollado un modelo animal de insuficiencia endotelial por descemetorrexia en conejo. El modelo es capaz de reproducir los cambios anatómo-patológicos asociados a queratopatía bullosa.
4. El trasplante del epitelio de la cápsula anterior del cristalino en un modelo animal de insuficiencia endotelial, a pesar de no regresar la transparencia corneal, es capaz de modificar la progresión de los cambios patológicos asociados a la queratopatía bullosa.

9. Actividades durante el PhD 2014-2018

Publicaciones.

1. [2016] "Human Bone Derived Collagen for the Development of an Artificial Corneal Endothelial Graft. In Vivo Results in a Rabbit Model". Natalia Vázquez, Manuel Chacón, Carlos A. Rodríguez-Barrientos, Jesús Merayo-Lloves, Miguel Naveiras, Begoña Baamonde, José F. Alfonso, Iriana Zambrano-Andazol, Ana C. Riestra, and Álvaro Meana. PlosONE.
2. [2017] "Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration. Transplant in a rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty." Natalia Vázquez Moreno, Carlos Rodríguez-Barrientos, Manuel Chacón Rodríguez, Jesus Merayo-Lloves, Miguel Naveiras Quiroga, Begoña Baamonde Arbaiza, J Alfonso, Iriana Zambrano Andazol, and Álvaro Meana Infiesta. Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS).
3. [2017] "ROCK inhibitor (Ripasudil) as coadjuvant after Descemetorhexis Without Endothelial Graft". Virgilio Galvis, Alejandro Tello, Johanna P. Fuquen, Carlos A. Rodríguez-Barrientos y Juan Martín Grice. Cornea.
4. [2018] "Primary explant culture and collagen I substrate enhances corneal endothelial cell morphology". Autores: Judith Zavala, María D. Montalvo-Parra, Guillermo-Isaac Guerrero-Ramírez, Carlos-Alberto Rodríguez-Barrientos; Victor Trevino; Jorge E. Valdez-García. Instituto Tecnológico de Monterrey. BMC Research Notes.

Congresos y ponencias.

1. [2014-Poster] ARVO 2014, Denver, Colorado, USA, 4 mayo, "Anterior lens capsule for endothelial grafts production", co-autores: Álvaro Meana, Manuel Chacon, Natalia Vazquez, Judith Zavala, Jorge E. Valdez, Jesus Merayo-Lloves.
1. [2015-Comunicaciones de investigación] 91 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, Palacio de Exposiciones y Congresos de Sevilla (FIBES); Sevilla, España, 23 de

septiembre, "Empleo de la cápsula anterior del cristalino para la producción de injertos", co-autores: Jesús Merayo Lloves.

2. [2016-Comunicaciones de investigación] Seminario de investigación en Salud, Hospital Zambrano-Hellion, Tecnológico de Monterrey, México, 15 enero, "Capsula anterior del cristalino para regeneración de la córnea".

3. [2016-Comunicaciones de investigación] Cursos de actualización de córnea y terapias avanzadas de la superficie ocular y córnea, Instituto Oftalmológico Fernández Vega; Oviedo, Asturias, España, 23 de febrero, "Capsula anterior de cristalino como queratoplastia endotelial", co-autores: Álvaro Meana.

4. [2016-Poster] ARVO 2016, Seattle, Washington, USA, 4 mayo, "Anterior lens capsule for endothelial grafts production", co-autores: Álvaro Meana, Manuel Chacon, Natalia Vazquez, Judith Zavala, Jorge E. Valdez, Jesus Merayo-Lloves.

5. [2017-Comunicaciones de investigación] Seminario de modelos animales para investigación en Medicina Regenerativa, Universidad Nacional de Colombia; Bogotá, Colombia, 24 de febrero, "Medicina regenerativa para la córnea".

6. [2017-Comunicaciones de investigación] Seminario de investigación de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Bucaramanga; Floridablanca, Santander, Colombia, 3 de abril, "Medicina regenerativa en Oftalmología".

7. [2017-Comunicaciones de investigación] Seminario de investigación. Escuela Superior de Oftalmología de la Clínica Barraquer; Bogotá, Colombia, 20 de noviembre, "Elaboración de sustitutos de endotelio corneal por medio de ingeniería de tejidos".

8. [2018-Poster] ARVO 2018 Pre-clinical Model of Bullous Keratopathy in Rabbit for Corneal Transplantation of Engineered Corneal Endothelial Grafts. ACEPTADO para presentarse en 2018 in Honolulu, Hawaii.

Visitas y estancias en Centros de Investigación.

1. [05/2016] Bascom Palmer Eye Institute, Miami, USA, Motivo: Potenciales transepiteliales en el endotelio de corneas donantes.
2. [01/2017-01/2018] Banco de Multitejidos y terapias avanzadas de la Clínica FOSCAL Internacional. Floridablanca, Colombia. Motivo: Terapias avanzadas en Oftalmología. Modalidad Doctorado con mención internacional.
3. [01/2018-06/2018] Clínica Barraquer-Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia. Terapias avanzadas en Oftalmología. Modalidad Doctorado con mención internacional.

Logros y financiaciones.

1. Convocatoria bienal trabajos de investigación. Proyecto aprobado: Medicina regenerativa para la ceguera corneal, Universidad Autónoma de Bucaramanga, (2 años).

Referencias

1. Oliva MS, Schottman T, Gulati M. Turning the tide of corneal blindness. *Indian J Ophthalmol*. 2012;60: 423–427. doi:10.4103/0301-4738.100540
2. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Heal Organ*. 2001;79: 214–221.
3. Depths ECL after P according to DAC. Endothelial Cell Loss after Phacoemulsification according to Different Anterior Chamber Depths. *J Ophthalmol*. 2015; doi:http://dx.doi.org/10.1155/2015/210716
4. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)*. 2003;17: 912–918. doi:10.1038/sj.eye.6700559
5. World Health Organization. Socio economics aspects of blindness and visual impairment [Internet]. 2017. Available: <http://www.who.int/blindness/economy/en/#>
6. Renaud J, Bédard E. Depression in the elderly with visual impairment and its association with quality of life. *Clin Interv Aging*. 2013;8: 931–943. doi:10.2147/CIA.S27717
7. Yoeruek E, Saygili O, Spitzer MS, Tatar O, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2009;28: 416–420. doi:10.1097/ICO.0b013e31818c2c36
8. Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg*. American Society of Cataract and Refractive Surgery; 1993;19: 232–235. doi:10.1016/S0886-3350(13)80947-9
9. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45: 2992–2997. doi:10.1167/iovs.03-1174
10. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45: 800–806. doi:10.1167/iovs.03-0016
11. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45: 2992–2997. doi:10.1167/iovs.03-1174
12. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45: 800–806. doi:10.1167/iovs.03-0016
13. Jochems CE1, van der Valk JB, Stafleu FR B V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anima*. 2002;30: 219–27.
14. Sabater AL, Guarnieri A, Espana EM, Li W, Prósper F, Moreno-Montañés J. Strategies of human corneal endothelial tissue regeneration. *Regen Med*. 2013;8: 183–195. doi:10.2217/RME.13.11

15. Krachmer & Mannis & Holland. CORNEA. 3ed editio. ELSEVIER, editor. 2010.
16. Tsubota K, Tseng SCG, Nordlund ML. Anatomy and Physiology of the Ocular Surface.
17. Gipson IK. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;48: 4390–4398. doi:10.1167/iops.07-0770.The
18. Pflugfelder SC. Tear Dysfunction and the Cornea: LXVII Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol. 2012;152: 900–909. doi:10.1016/j.ajo.2011.08.023.Tear
19. Ophthalmology AA of. External Disease and Cornes.
20. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011;37: 588–598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037
21. Care university of IH. Penetrated keratoplasty [Internet]. 2016. Available: <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/tutorials/Cornea-Transplant-Intro/2-PK.htm>
22. Krachmer, Jay; Mannis Mark; Hollard E. Cornea. 3er ed. ELSEVIER, editor.
23. P. Eroschenko V. diFIORE's Atlas of Histology with functional correlations [Internet]. Vasa. 2008. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00956.x
24. Levy S, Moss J, Sawada H, Dopping-Hepenstal P, McCartney A. The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased Descemet's membrane. Curr Eye Res. 1996;15: 45–52.
25. Jakus MA. Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. J Biophys Biochem Cytol. 1956;2: 243–252. doi:10.1083/jcb.2.4.243
26. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. J Cell Biol. 1990;110: 1457–1468. doi:10.1083/jcb.110.4.1457
27. Bonanno J. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. Prog Retin Eye Res. 2003;22: 69–94.
28. Srinivas S. Dynamic Regulation of Barrier Integrity of the Corneal Endothelium. Optom Vis Sci Off Publ 2010;87: 1–28. doi:10.1097/OPX.0b013e3181d39464.Dynamic
29. Bonanno JA. Molecular mechanism underlying the corneal endothelila pump. Exp Eye Res. 2012;29: 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
30. Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. Investig Ophthalmol Vis Sci. 1996;37: 645–655.
31. Yamashiro Y, Sasaki H, Ibaraki N, Nagai K, Kawakami Y, Yaguchi H, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16 and p21 expression, and cell cycle change in human lens epithelial cell line SRA 01/04 following contact inhibition in normal culture. Ophthalmic Res. 2011;46: 38–43. doi:10.1159/000322805
32. Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: Contact inhibition and TGF- β 2. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2002;43: 2152–2159.
33. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41: 660–667.

34. Sherrard ES. The corneal endothelium in vivo: its response to mild trauma. *Exp Eye Res.* 1976;22: 347–357. doi:10.1016/0014-4835(76)90227-X
35. Bourne WM. Corneal endothelium-past, present, and future. *Eye Contact Lens.* 2010;36: 310–314. doi:10.1097/ICL.0b013e3181ee1450
36. Corneal H, Cells E, Egan C a, Savre-train I, Shay JW, Wilson SE, et al. Analysis of Telomere Lengths in from Donors of Different Ages. 1998;39: 648–653.
37. Gonçalves ED, Campos M, Paris F, Gomes JA FC. Bullous keratopathy: etiopathogenesis and treatment. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;Nov-Dic: 61–4.
38. Bourne WM, Hodge DO, McLaren JW. Estimation of corneal endothelial pump function in long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol VisSci.* 1999;40: 603–611.
39. Bigar F WR. Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology.* 1982;89: 596–599.
40. Wilson RS, Thompson SM. Changes in endothelial cell density following accidental trauma. 1982; 518–519.
41. Schein OD, Cassard SD, Tielsch JM, Gower EW. Cataract surgery among Medicare beneficiaries. *Ophthalmic Epidemiol.* 2012;19: 257–64. doi:10.3109/09286586.2012.698692
42. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and dema. *Invest Ophthalmol.* 2006;46: 2650–2661. doi:10.1167/iov.05
43. Liu T, Xu Y, Sun D, Xie L. Histological evaluation of corneal scar formation in pseudophakic bullous keratopathy. *PLoS One.* 2012;7: 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0039201
44. Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S, Yagi Y, Tsubota K SJ. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology.* 113. doi:10.1016/j.ophtha.2006.01.034
45. Akpek EK, Alkharashi M, Hwang FS, MNg S, Lindsley K. Artificial corneas versus donor corneas for repeat corneal trasnplants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;5: 1–29. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
46. Thompson RW, Price MO, Bowers PJ, Price FW. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 2003;110: 1396–1402. doi:10.1016/S0161-6420(03)00463-9
47. Melles GR1, Lander F RF. Transplantation of Descemet’s membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea.* 2002;21.
48. America EBA of. 2015 Eye Banking Statistical Report. 2016;
49. Lewis JS. Expanding uses for AS-OCT. In: *Ophthalmology Management [Internet].* 2017. Available: <http://www.ophtalmologymanagement.com/issues/2015/march-2015/expanding-uses-for-as-oct>
50. Cortina, M. Soledad D la CJ. *Keratoprotheses and Artificial Corneas: Fundamentals and Surgical Applications.* Springer; 2015. doi:10.1007/978-3-642-55179-6_7

51. Zhu C, Joyce N. Proliferative Response of Corneal Endothelial Cells from Young and Older Donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45: 1743–1751. doi:10.1167/iops.03-0814
52. Peh GSL, Toh K-P, Ang H-P, Seah X-Y, George BL, Mehta JS. Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures in vitro. *BMC Res Notes. BMC Research Notes*; 2013;6: 176. doi:10.1186/1756-0500-6-176
53. Kim EY, Tripathy N, Cho SA, Joo CK, Lee D, Khang G. Bioengineered neo-corneal endothelium using collagen type-I coated silk fibroin film. *Colloids Surf B Biointerfaces. Elsevier B.V.*; 2015;1: 394–401. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.041
54. Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg. American Society of Cataract and Refractive Surgery*; 1993;19: 232–235. doi:10.1016/S0886-3350(13)80947-9
55. Kopsachilis N, Tsinopoulos I, Tourtas T, Kruse FE, Luessen UW. Descemet's membrane substrate from human donor lens anterior capsule. *Clin Exp Ophthalmol.* 2012;40: 187–194. doi:10.1111/j.1442-9071.2011.02678.x
56. Walshe J, Harkin DG. Serial explant culture provides novel insights into the potential location and phenotype of corneal endothelial progenitor cells. *Exp Eye Res. Elsevier Ltd*; 2014;127: 9–13. doi:10.1016/j.exer.2014.07.002
57. Peh GSL, Toh KP, Wu FY, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0028310
58. Peh GSL, Toh K-P, Wu F-Y, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One.* 2011;6: e28310. doi:10.1371/journal.pone.0028310
59. Savion N, Farzame N. Characterization of the Na, K-ATPase pump in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 1986;43: 355–363. doi:10.1016/S0014-4835(86)80072-0
60. Noske W, Fromm M, Levarlet B, Kreusel KM HM. Tight junctions of the human corneal endothelium: morphological and electrophysiological features. *Ger J Ophthalmol.* 1994;
61. Chng Z, Peh GSL, Herath WB, Cheng TYD, Ang HP, Toh KP, et al. High Throughput Gene Expression Analysis Identifies Reliable Expression Markers of Human Corneal Endothelial Cells. *PLoS One.* 2013;8: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0067546
62. Cells E, Bartakova A, Alvarez-delfin K, Weisman AD, Salero E, Raffa GA, et al. Novel Identity and Functional Markers for Human Corneal. 2016; 1–3. doi:10.1167/iops.15-18826
63. Schey KL, Wang Z, L. Wenke J, Qi Y. Aquaporins in the eye: Expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840: 1513–1523. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.037
64. Kuang K, Yiming M, Wen Q, Li Y, Ma L, Iserovich P, et al. Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice. *Exp Eye Res.* 2004;78: 791–798. doi:10.1016/j.exer.2003.11.017
65. Williams K, Watsky M. Gap junctional communication in the human corneal endothelium and epithelium. *Curr Eye Res.* 2002;25: 29–36. doi:10.1076/ceyr.25.1.29.9964

66. Konomi K, Zhu C, Harris D, Joyce NC. Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46: 4086–4091. doi:10.1167/iovs.05-0245
67. Ju C, Gao L, Wu X, Pang K. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. *Indian J Med Res.* 2012;135: 887–894.
68. Chengqun Ju; Li Gao; Xinyi Wu and KP. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. *indian J Med Res.* 2012;jun: 887–894.
69. Chaco M, Rodri CA, Naveiras M, Alfonso JF, Zambrano- I. Human Bone Derived Collagen for the Development of an Artificial Corneal Endothelial Graft . In Vivo Results in a Rabbit Model. 2016; 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0167578
70. Sliney D. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol.* 2002;21: 501–9.
71. Cabrera MP, Chihuailaf RH. Antioxidants and the integrity of ocular tissues. *Vet Med Int.* 2011; 905153. doi:10.4061/2011/905153
72. He Z, Forest F, Gain P, Rageade D, Bernard A, Acquart S, et al. 3D map of the human corneal endothelial cell. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group;* 2016; 1–14. doi:10.1038/srep29047
73. Peh GSL, Chng Z, Ang H, Cheng TYD, Adnan K, Seah X, et al. Propagation of Human Corneal Endothelial Cells : A Novel Dual Media Approach. 2015;24: 287–304.
74. Okumura N, Hirano H, Numata R, Nakahara M, Ueno M, Hamuro J, et al. Cell surface markers of functional phenotypic corneal endothelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55: 7610–7618. doi:10.1167/iovs.14-14980
75. Cvekl A, Ashery-Padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development. *Development.* 2014;141: 4432–4447. doi:10.1242/dev.107953
76. Dhouailly D1, Pearton DJ MF. The vertebrate corneal epithelium: from early specification to constant renewal. *Dev Dyn.* 243: 1226–41.
77. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye (Lond).* 1990;4: 389–424. doi:10.1038/eye.1990.53
78. Zinn KM. Changes in corneal ultrastructure resulting from early lens removal in the developing chick embryo. *Invest Ophthalmol.* 1970;9: 165–82. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5416396>
79. Beebe DC, Coats JM. The Lens Organizes the Anterior Segment : Specification of Neural Crest Cell Differentiation in the Avian Eye. *Dev Biol.* 2000;220: 424–431. doi:10.1006/dbio.2000.9638
80. Bhat SP. The ocular lens epithelium. *Biosci Rep.* 2001;21: 537–563. doi:10.1023/A:1017952128502
81. Karim AK, Jacob TJ, Thompson GM. The human anterior lens capsule: cell density, morphology and mitotic index in normal and cataractous lenses. *Exp Eye Res.* 1987;45: 865–874. doi:10.1016/S0014-4835(87)80102-1
82. Saika S, Werner L, Lovicu FJ. Lens Epithelium and Posterior Capsular Opacification. 2014.

83. Bassnett S, Shi Y, Vrensen GFJM. Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366: 1250–1264. doi:10.1098/rstb.2010.0302
84. Danysh BP, Duncan MK. The lens capsule. *Exp Eye Res.* Elsevier Ltd; 2009;88: 151–164. doi:10.1016/j.exer.2008.08.002
85. Brinker JM, Pegg MT, Howard PS, Kefalides NA. Immunochemical Characterization of Type IV Procollagen from Anterior Lens Capsule. *Collagen Rel Res.* 1985;5: 233–244. doi:10.1016/S0174-173X(85)80013-3
86. Margit Pavelka and Jürgen Roth. *Functional Ultrastructure* [Internet]. Springer. 2010. doi:10.1016/j.parint.2010.07.001
87. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol.* 1990;110: 1457–1468. doi:10.1083/jcb.110.4.1457
88. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25: 1402–15.
89. Barraquer RI, Michael R, Abreu R, Tresserra F. Human Lens Capsule Thickness as a Function of Age and Location along the Sagittal Lens Perimeter. 2016;47. doi:10.1167/iovs.05-1002
90. Morton K, Hutchinson C, Jeanny J, Karpouzias I, Pouliquen Y, Courtois Y. Colocalization of fibroblast growth factor binding sites with extracellular matrix components in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res.* 1989;8: 975–87.
91. Danielsen CC. Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule. *Exp Eye Res.* 2004;79: 343–350. doi:10.1016/j.exer.2004.05.014
92. Coulombre JL, Coulombre AJ. Lens Development: Fiber Elongation and Lens Orientation. *Science (80-).* 1963;142: 1489–1490.
93. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progi Retin Eye Res.* 2003;22: 359–389. doi:10.1016/S1350-9462(02)00065-4
94. Bassnett S, Shi Y, Vrensen GFJM. Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2011;366: 1250–1264. doi:10.1098/rstb.2010.0302
95. Oka M, Toyoda C, Kaneko Y, Nakazawa Y, Aizu-Yokota E, Takehana M. Characterization and localization of side population cells in the lens. *Mol Vis.* 2010;16: 945–953. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2890558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Behar-Cohen F, Martinsons C, Viénot F, Zissis G, Barlier-Salsi A, Cesarini JP, Enouf O, Garcia M, Picaud S AD. Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res.* 2011;30: 239–57. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.04.002
97. Roberts JE. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *Eye Contact Lens.* 2011;37: 246–9. doi:10.1097/ICL.0b013e31821cbcc9
98. Pitts DG, Bergmanson JP, Chu LW. Ultrastructural analysis of corneal exposure to UV

- radiation. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1987;65: 263–273.
99. Ullrich K1 CR. Does anybody care that the crystalline lens never gets cancer.
 100. Zhang ML, Guo AX, VandenBussche CJ. Morphologists overestimate the nuclear-to-cytoplasmic ratio. *Cancer Cytopathol*. 2016;124: 669–677. doi:10.1002/cncy.21735
 101. EBAA. 2015 Medical Standards. 2015; 1–62.
 102. Sugar J, Montoya M, Dontchev M, Tanner JP, Beck R, Gal R, et al. Donor Risk Factors for Graft Failure in the Cornea Donor Study Joel. *Cornea*. 2011;28: 981–985. doi:10.1097/ICO.0b013e3181a0a3e6.Donor
 103. Sugar A, Montoya MM, Beck R, Cowden JW, Dontchev M, Gal RL, et al. Impact of the Cornea Donor Study (CDS) on Acceptance of Corneas from Older Donors. 2014;31: 1441–1445. doi:10.1097/ICO.0b013e31823f7550.Impact
 104. Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, Sherwin T, Ormonde S, Clover GM MC. The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea*. 24: 576–82.
 105. Crime UNO on D and. Global Study on Homicide 2013. Unodoc. 2013. doi:10.1016/j.jcv.2011.08.025
 106. Bank TW. Latin America: Time to Put a Stop to Road Deaths. In: May 10 [Internet]. 2013. Available: <http://www.worldbank.org/en/news/feature/2013/05/10/accidentes-trafico-carreteras-america-latina>
 107. Krohn J, Høvdig G. The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005;83: 746–750. doi:10.1111/j.1600-0420.2005.00570.x
 108. Leibowitz. RALMMSHM. In Vivo Photomicrography of the Corneal Endothelium. *JAMA Ophthalmol*. 1975;93: 143–145. doi:doi:10.1001/archopht.1975.01010020149013
 109. T S. Mosaic pattern changes in human corneal endothelium with age. *Jpn J Ophthalmol*. 1984;28: 331–338.
 110. Asano R, Majima K, Naitou N, Yamamoto N, Ichikawa K. The Nucleoplasmic Ratio of Lens Epithelial Cells were Studied from the Central Portion to the Proliferative Zone of the Lens. 2015;27: 63–67.
 111. Levy SG1, Moss J, Sawada H, Dopping-Hepenstal PJ MA. The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased Descemet's membrane. *Curr Eye Res*. 1996;15: 45–52.
 112. Bourne WM, Johnson DH CR. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 100: 1952–5.
 113. Poulsen ET, Dyrflund TF, Runager K, Scavenius C, Krogager TP, Hojrup P, et al. Proteomics of Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy support that the extracellular matrix of Descemet's membrane is disordered. *J Proteome Res*. 2014; doi:10.1021/pr500252r
 114. Eghrari, A. Gottsch J. Fuchs corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010. 2011;5: 147–159. doi:10.1586/eop.10.8.

115. Giepmans BNG, van IJendoorn SCD. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* Elsevier B.V.; 2009;1788: 820–831. doi:10.1016/j.bbamem.2008.07.015
116. Shin K, Fogg VC MB. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22: 207–35. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219
117. St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: Parallels and diversity. *Cell.* 2010;141: 757–774. doi:10.1016/j.cell.2010.05.011
118. Srinivas SP. Dynamic Regulation of Barrier Integrity of the Corneal Endothelium. *Optom Vis Sci.* 2010;87: 1–28.
119. White TW1 BR. Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity. *Brain Res Brain Res Rev.*
120. Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T. Connexin43 knockdown accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury in vivo. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49: 93–104. doi:10.1167/jovs.07-0255
121. Kasper C, Rasmussen H, Kastrop JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, Bock E LI. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol.* 2000;May;7: 389–93. doi:10.1038/75165
122. GO. K. Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 23: 285–93.
123. Bo Huang, Gustavo Blanco RM. Human Corneal Endothelial Cell expression of Na⁺,K⁺-Adenosin Triphosphatase Isoforms. *Arch Ophthalmol.* 2003;121: 840–845.
124. Sánchez JM1, Li Y, Rubashkin A, Iserovich P, Wen Q, Ruberti JW, Smith RW, Rittenband D, Kuang K, Diecke FP FJ. Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. *J Membr Biol.* 187: 37–50. doi:10.1007/s00232-001-0151-9
125. Schey KL, Wang Z, L. Wenke J, Qi Y. Aquaporins in the eye: Expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840: 1513–1523. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.037
126. Kuang K1, Yiming M, Wen Q, Li Y, Ma L, Iserovich P, Verkman AS FJ. Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice. *Exp Eye Res.* 2004;78: 791–798.
127. Yeh S, Scholz DL, Liou W, Rafferty NS. Polygonal arrays of actin filaments in human lens epithelial cells. An aging study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27: 1535–1540.
128. Rafferty NS1, Scholz DL, Goldberg M LM. Immunocytochemical evidence for an actin-myosin system in lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 51: 591–600.
129. Johnstone MA. Pressure-dependent changes in nuclei and the process origins of the endothelial cells lining Schlemm's canal. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1979;18: 44–51.
130. Mendez MG, Restle D JP. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J.* 2014;Jul 15;107.

131. Risen L a, Binder PS, Nayak SK. Intermediate filaments and their organization in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28: 1933–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316108>
132. Daniell H. Lens Intermediate filaments. 2012;76: 211–220. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
133. Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester J V. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36: 1115–1124.
134. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Chapter 19Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. 2002.
135. Danen EHJ. Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. *Madame Curie Bioscience Database [Internet].* 2013.
136. Ljubimov AV, Huang Z-S, Huang GH, Burgeson RE, Gullberg D, Miner JH, et al. Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem.* 1998;46: 1033–1041.
137. Ophthalmology AA of. Pump Leak Theory. In: *Basic and Clinical Science course.* 2017.
138. Harrison TA, He Z, Boggs K, Thuret G, Liu H-X, Defoe DM. Corneal endothelial cells possess an elaborate multipolar shape to maximize the basolateral to apical membrane area. *Mol Vis.* 2016;22: 31–39.
139. Delamere N a., Dean WL. Distribution of lens sodium-potassium-adenosine triphosphatase. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34: 2159–2163.
140. Ong MD, Payne DM, Garner MH. Differential protein expression in lens epithelial whole-mounts and lens epithelial cell cultures. *Exp Eye Res.* 2003;77: 35–49. doi:10.1016/S0014-4835(03)00090-3
141. Garner MH, Kong Y. Lens epithelium and fiber Na, K-ATPase: Distribution and Localization by Immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40: 2291–2298.
142. Tsuji T, Lin L-R, Murata Y, Reddy VN. Immunohistochemical localization of Na,K-ATPase in the in situ lens, cultured human lens epithelium and lentoid. *Exp Eye Res.* 1992;55: 469–478. doi:10.1016/0014-4835(92)90120-H
143. Dahm R, van Marle J, Quinlan R a, Prescott AR, Vrensen GFJM. Homeostasis in the vertebrate lens: mechanisms of solute exchange. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366: 1265–1277. doi:10.1098/rstb.2010.0299
144. Katar M, Alcalá J MH. NCAM of the mammalian lens. *Curr Eye Res.* 1993;12: 191–196.
145. Verkman A. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res.* 2003;76: 137–143.
146. Mathias RT, Rae JL. The lens: Local transport and global transparency. *Exp Eye Res.* 2004;78: 689–698. doi:10.1016/j.exer.2003.07.001
147. Halfter W, Monnier C, Müller D, Oertle P, Uechi G, Balasubramani M, et al. The Bi-

Functional Organization of Human Basement Membranes. PLoS ONE. 2013.
doi:10.1371/journal.pone.0067660

148. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC, et al. Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: Transplant in a rabbit descemet membrane endothelial keratoplasty. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58: 3357–3365. doi:10.1167/iov.17-21797
149. Alina Akhbanbetova, 1 Shinichiro Nakano, 2 Stacy L. Littlechild, 1 Robert D. Young, 1 Madara Zvirgzdina, 1 Nigel J. Fullwood, 3 Ian Weston, 4 Philip Weston, 4 Shigeru Kinoshita, 5 Naoki Okumura, 2 Noriko Koizumi 2 and Andrew J. Quantock1. A Surgical Cryoprobe for Targeted Transcorneal Freezing and Endothelial Cell Removal. *J Ophthalmol*. 2017; doi:https://doi.org/10.1155/2017/5614089
150. Han SB, Ang H, Balehosur D, Peh G, Chaurasia SS, Tan DTH, et al. A mouse model of corneal endothelial decompensation using cryoinjury. *Mol Vis*. 2013;19: 1222–30.
151. Ju C, Yang H WX. Construction of corneal endothelium deficiency model by cryo-injury and its application. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2014;Apr: 273–276.
152. Ang M, Konstantopoulos A, Goh G, Htoon HM, Seah X, Lwin NC, et al. Evaluation of a Micro-Optical Coherence Tomography for the Corneal Endothelium in an Animal Model. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6: 29769. doi:10.1038/srep29769
153. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46: 3637–3644. doi:10.1167/iov.05-0462
154. Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S MN. A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea*. 2008;Jul: 699–705. doi:10.1097/QAJ.0b013e31815e722b
155. Schwartzkopff J, Bredow L, Mahlenbrey S, Boehringer D, Reinhard T. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. *Mol Vis*. 2010;16: 2368–2375.
156. Choi SO, Jeon HS, Hyon JY, Oh Y, Wee WR. Recovery of Corneal Endothelial Cells from Periphery after Injury. 2015; 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0138076
157. Oh JY, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Wee WR U. Comparative observation of freeze-thaw-induced damage in pig, rabbit, and human corneal stroma. *Vet Ophthalmol*. 2009;Nov-Dec;12: 50–6.
158. Oh JY, Lee HJ, Khwarg SI, Wee WR. Corneal cell viability and structure after transcorneal freezing-thawing in the human cornea. *Clin Ophthalmol*. 2010;4: 477–480.
159. Brockmann T1, Brockmann C, Maier AK, Schroeter J, Pleyer U, Bertelmann E, Jousen AM TN. Clinicopathology of graft detachment after Descemet’s membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol*. 2014;Nov: e556-61.
160. Mimura T, Yokoo S, Yamagami S. Tissue Engineering of Corneal Endothelium. *J Funct Biomater*. 2012;3: 726–744. doi:10.3390/jfb3040726
161. Melles GR1, Wijdh RH NC. A technique to excise the descemet membrane from a recipient

cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004;Apr: 286–8.

162. Tannenbaum J, Bennett BT, Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54: 120–32. doi:10.1016/s0266-6138(98)90010-9
163. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research. 2016. Available: www.arvo.org/About_ARVO/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/
164. Francisco E. Fantes, MD; Khalil D. Hanna, MD; George O. Waring III, MD; Yves Pouliquen, MD; Keith P. Thompson MMS. Wound Healing After Excimer Laser Keratomileusis (Photorefractive Keratectomy) in Monkeys. *JAMA Ophthalmol*. 1990;180: 665–675.
165. Miyata K. A Novel Grading Method for Superficial Punctate Keratopathy Magnitude and Its Correlation With Corneal Epithelial Permeability. *Arch Ophthalmol*. 2003;121: 1537. doi:10.1001/archophth.121.11.1537
166. Mimura T, Amano S, Usui T, Araie M, Ono K, Akihiro H, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res*. 2004;79: 231–237. doi:10.1016/j.exer.2004.05.001
167. Zhu Q, Wu M, Sun X, Zhang W, Hu Z, Liu H. Original Article Transplantation of cultured rhesus monkey vascular endothelial cells to allogeneic cornea concomitant with stripping of Descemet's membrane. 2015; doi:10.4103/0301-4738.169788
168. Mimura T, Yokoo S, Yamagami S. Tissue Engineering of Corneal Endothelium. *J Funct Biomater*. 2012;3: 726–744. doi:10.3390/jfb3040726
169. Mohamed TA. Postoperative corneal edema. *J Ocul Infect*. 2017;1: 1000.
170. B. Seits WL, editor. *Corneal Dystrophies*. Karger Medical and Scientific Publishers, 2011; 2011.
171. Chen J, Li Z, Zhang L, Ou S, Wang Y, He X, et al. Descemet's Membrane Supports Corneal Endothelial Cell Regeneration in Rabbits. *Sci Rep*. 2017;7: 6983. doi:10.1038/s41598-017-07557-2
172. Glasgow BJ, Gasyimov OK, Casey RC. Exfoliative epitheliopathy of bullous keratopathy with breaches in the MUC16 glyocalyx. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50: 4060–4064. doi:10.1167/iops.08-3361
173. Eagle BYRC, Laibson PR, Arentsen JJ. EPITHELIAL ABNORMALITIES IN CHRONIC CORNEAL EDEMA : A HISTOPATHOLOGICAL STUDY *. 1989;LXXXVII.
174. Bron AJ, Tripathi RC. Cystic disorders of the corneal epithelium. I. Clinical aspects. *Br J Ophthalmol*. 1973;57: 361–375. Available: <http://bj.o.bmj.com/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4541667>
175. Bron AJ, Tripathi RC. Cystic disorders of the corneal epithelium. I. Pathogenesis. *Br J Ophthalmol*. 1973;57: 361–375.
176. Morishige N, Nomi N, Morita Y NT. Immunohistofluorescence analysis of myofibroblast

- transdifferentiation in human corneas with bullous keratopathy. *Cornea*. 30: 112934. doi:10.1097/ICO.0b013e318213798d
177. Wilson SL, El Haj AJ, Yang Y. Control of scar tissue formation in the cornea: strategies in clinical and corneal tissue engineering. *J Funct Biomater*. 2012;3: 642–87. doi:10.3390/jfb3030642
 178. Zieske JD, Guimarães SR HA. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res*. 72: 33–9. doi:10.1006/exer.2000.0926
 179. Michels RG, Kenyon KR MA. Retrocorneal fibrous membrane. *Invest Ophthalmol*. 1972;11.
 180. Jiucheng He JPE& HEPB. The Induction of an Angiogenic Response in Corneal Myofibroblasts by Platelet-Activating Factor (PAF). *Curr Eye Res*. 2010;35: 1063–1071.
 181. Ambati YQMK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*. 2009;88.
 182. Fallis A. Animal Models in Eye Research. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 183. Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH BP. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea*. 17: 618–26.
 184. America E bank association of. 2013 Eye Banking satatistical report. 2014; 1–6.
 185. Ang M, Wilkins MR, Mehta JS, Tan D. Descemet membrane endothelial keratoplasty. 2016; 15–21. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-306837
 186. America EBA of. 2013 Eye banking Statistical Report. *Eye Bank Assoc Am*. 2014; 1–114.
 187. Fernandez MM, Afshari N a. Endothelial Keratoplasty: From DLEK to DMEK. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2010;17: 5–8. doi:10.4103/0974-9233.61210
 188. Koizumi N. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2009;113: 1050–1059. doi:10.1167/iovs.07-0567
 189. Qazi Y, Hamrah P. Corneal Allograft Rejection: Immunopathogenesis to Therapeutics. *J Clin Cell Immunol*. 2014;2013: 1–21. doi:10.4172/2155-9899.S9-006.Corneal
 190. Seigel GKA. The enigma of lenticular oncology. *Digit J Ophthalmol*. 2001;7.
 191. Dua HS A-BA. Corneal allograft rejection: risk factors, diagnosis, prevention, and treatment. *Indian J Ophthalmol*. 1999;Mar: 3–9.
 192. Khodadoust AA, Silverstein AM. Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. *Invest Ophthalmol*. 1969;8: 180–195.
 193. Verdier DD, Sugar A, Baratz K, Beck R, Dontchev M, Dunn S, et al. Corneal thickness as a predictor of corneal transplant outcome. *Cornea*. 2013;32: 729–736. doi:10.1097/ICO.0b013e31827b14c7
 194. Kidd GL, Reddan JR RP. Differentiation and angiogenic growth factor message in two mammalian lens epithelial cell lines. *Differentiation*. 1994;Apr;56: 67–74.
 195. Larkin DFP. Corneal allograft rejection. *Br J Ophthalmol*. 1994; 649–652. doi:10.1136/bjo.78.8.649

ROCK Inhibitor (Ripasudil) as Coadjuvant After Descemetorhexis Without an Endothelial Graft

To the Editor:

We read with interest the article by Moloney et al on descemetorhexis without grafting for Fuchs endothelial dystrophy using an Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor (ripasudil, previously known as K-115) as a coadjutant in 2 eyes that failed to clear by month 2 and in a third case with a small area of persistent focal edema.¹ Our first concern is that the age of the patients was not

indicated. How many of the eyes were phakic and how many were pseudophakic? Were any of the descemetorhexis procedures performed along with phacoemulsification?

In a case that we reported on, a patient who underwent descemetorhexis without grafting along with phacoemulsification and intraocular lens implantation, we noted a persistent area of paracentral edema, which eventually generated a fibrotic leukoma (Fig. 1).² Moloney et al mentioned that in case 9 of their series, a patch of microcystic edema persisted outside the visual axis, within the stripped area at month 5. The patient received ripasudil 6 times a day during 2 weeks, and edema disappeared. According to their results, we believe that if we had used such an approach in our patient, the visual results would have been even better.

Retrospectively reviewing the case we reported, we found that the shape of

the descemetorhexis was rather irregular, and the size was approximately 5.5 to 5.8 mm high and 3.5 to 3.8 mm wide, including the peripheral superior cornea. Although the patient reached a distance-corrected visual acuity of 20/30-2, 16 months after surgery, 5 months later in her last visit, it decreased to 20/70. Now, we believe that the rhexis size and the involvement of the superior peripheral endothelium could have been related to the persistence of the patch of paracentral edema that eventually led to the presence of a paracentral leukoma (Fig. 1). As mentioned by Moloney et al, sizes of the descemetorhexis larger than 4 mm in diameter have been linked to persistent edema.¹⁻⁵ In addition, after a failed descemetorhexis without an endothelial graft, the case might become challenging for Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) because of the presence of fibrosis in

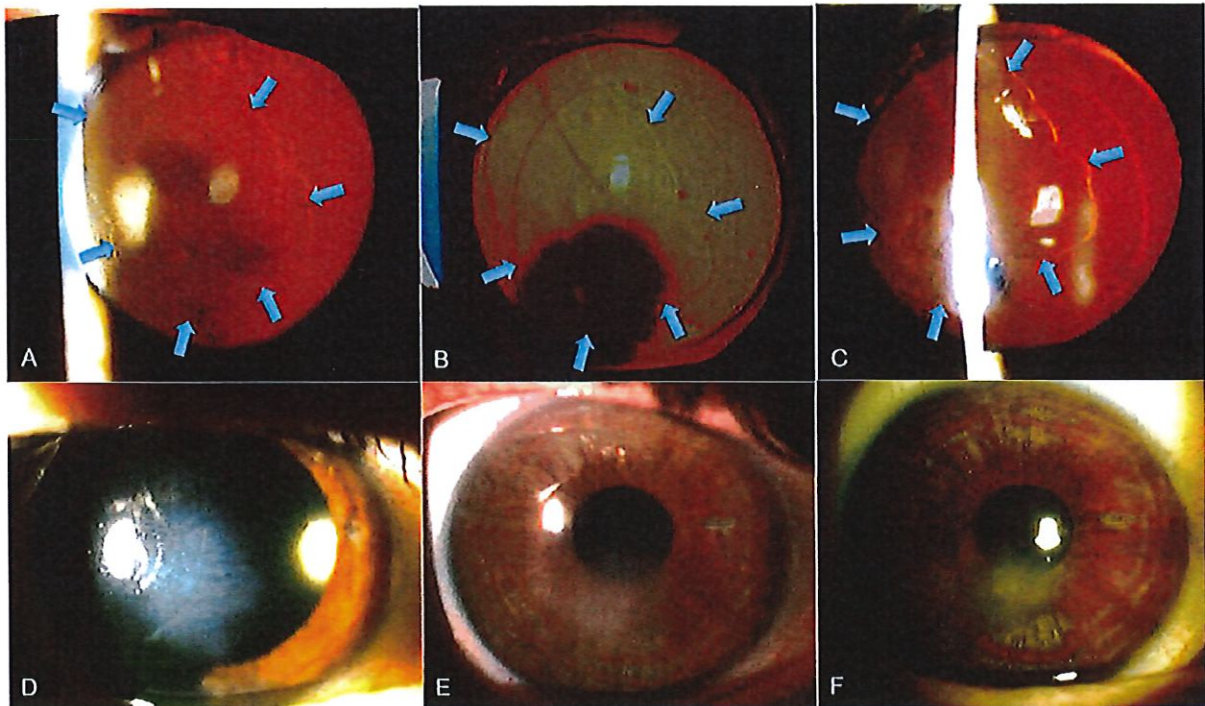


FIGURE 1. Slit-lamp photographs of a 67-year-old woman who underwent descemetorhexis without grafting along with phacoemulsification and intraocular lens implantation. A and D, One month after surgery. The shape of the descemetorhexis is rather irregular, with around 5.5 mm high and 3.5 mm wide (blue arrows). A central area of persistent stromal and epithelial (microcystic) edema was evident. B and E, One year postoperatively, a leukoma developed in the area of paracentral focal persistent edema. C and F, Twenty-one months after the procedure, the leukoma persisted. The final-corrected distance visual acuity was 20/70.

stroma or prevention of attachment of the DMEK graft on areas with endothelial cells.^{2,5} However, recently, Rao et al⁶ (from the group of Colby) reported good outcomes of DMEK in 3 patients with Fuchs endothelial dystrophy after failed Descemet stripping without an endothelial graft. They did not attempt to scrape the posterior stroma in any case and achieved complete corneal clearance without the need for rebubbling.

We consider that the results shown by Moloney et al using short-term supplementation with a topical ROCK inhibitor (riipasudil) are very encouraging and might open a way to apply this approach more frequently. However, a big concern is the low final values of the endothelial cell count at the last follow-up visit (12 ± 8.2 months on average, with a range between 4 and 30 months). The mean was only 765.6 ± 226 cells/mm². Four eyes (33.3% of the group) had less than 600 cells/mm², with one of those with 494 cells/mm² (which is below the traditionally accepted limit for corneal edema). Furthermore, almost all eyes (11 of 12, ie, 91.7%) showed a cell density below 1000 cells/mm².¹

Lee and Munir recently reported a case of eventual corneal endothelial cell failure after initial spontaneous resolution of corneal edema following failed DMEK, in a patient with Fuchs dystrophy (a 9.00-mm diameter descemetorhexis had been performed).⁷ The cornea gained transparency, and an endothelial cell count of 1139 cells/mm² was found 8 months after surgery. However, by 2 ½ years postoperatively, the cornea became edematous, and specular microscopy revealed the absence of discernable cells.⁷ This could be the fate of many of these patients after descemetorhexis without transplantation. They have corneas with acceptable transparency, but with too low cell density. The procedure would only be working to postpone the need for an endothelial graft. Because Fuchs dystrophy is a progressive condition, and in addition, an age-related endothelial cell loss occurs, would not it be appropriate to keep those eyes, with such low cell counts, in a continuous treatment with an ROCK inhibitor?

In a case series, Okumura et al (from the group led by Kinoshita) found

that using the ROCK inhibitor Y-27632 for only 1 week, after transcorneal freezing to remove central corneal endothelial cells, diminished pachymetry in 3 of 4 eyes of patients with Fuchs dystrophy, although a significant change was observed (both in corneal thickness and visual acuity) just in 1 eye.^{8,9} However, the response in that patient was remarkably positive. Central endothelial density was not possible to be determined before the procedure, and in the paracentral area, there was a low cell count with guttae. Six months after treatment, cell densities were 1200 to 1500 cells/mm² in both areas, which suggests that the in vivo proliferation of human corneal endothelial cells (HCECs) was stimulated by Y-27632.^{8,9}

In response to a letter to the editor commenting on this study, Koizumi et al, from the same group of researchers, mentioned that using Y-27632 for more than a couple of weeks was cost prohibitive.^{10,11} We wonder what approximately is the cost of using the commercially available ripasudil (Glanatec ophthalmic solution 0.4%, Kowa Co Ltd, Nagoya, Aichi, Japan) and the availability of the product outside Japan.

Particularly with ripasudil, Okumura et al have also already published that in vitro cultured HCECs treated with this substance showed many more 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive cells than among the control HCECs, indicating increased DNA synthesis. Immunohistochemistry also revealed that the numbers of cells staining for the proliferative EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) and Ki67 markers were greater for the cell cultures treated with ripasudil. Furthermore, in a mechanical scraping rabbit model, ripasudil-treated eyes showed less corneal edema and more cell proliferation of the residual corneal endothelium ($91.5\% \pm 2.0\%$ Ki67-positive cells after 48 hours, whereas the control eyes showed only $52.6\% \pm 1.3\%$). Five of 6 corneas became transparent in ripasudil-treated eyes, whereas none of 6 corneas became transparent in the control eyes during the 14 days of the study. Finally, the corneal endothelial cell density of the eyes treated with ripasudil was significantly higher in all areas (nondamaged areas, borders, and

damaged areas) than in the eyes treated with the vehicle.¹²

Combining these experimental results with the clinical outcomes shown by Moloney et al, we believe that although additional studies are required to confirm the possible benefits, because it may accelerate the healing process of the denuded area and increase the likelihood of success of the procedure, it is justified to use ripasudil as an adjuvant in all patients undergoing descemetorhexis without endothelial transplantation. Furthermore, it sounds reasonable to keep it as a permanent treatment to possibly stimulate endothelial cell mitosis (which is naturally inhibited in vivo in humans and possibly more affected in Fuchs dystrophy cases) to maintain stable those very low cell densities.

Financial disclosures/conflicts of interest: None reported.

Virgilio Galvis, MD*††
Alejandro Tello, MD*††
Johanna P. Fuquen, MD*†
Carlos A. Rodríguez-Barrientos, MD†§
Juan Martín Grice, MD*

*Centro Oftalmológico Virgilio Galvis,
Floridablanca, Colombia

†Universidad Autónoma de Bucaramanga,
Bucaramanga, Colombia

‡Fundación Oftalmológica de Santander
(FOSCAL), Floridablanca, Colombia

§Instituto Universitario Fernández-Vega,
Universidad de Oviedo,
Oviedo, Spain

REFERENCES

- Moloney G, Peisoglou C, Ball M, et al. Descemetorhexis without grafting for Fuchs endothelial dystrophy-supplementation with topical ripasudil. *Cornea*. 2017;36:642-648.
- Galvis V, Tello A, Berrospi RD, et al. Descemetorhexis without endothelial graft in Fuchs dystrophy. *Cornea*. 2016;35:e26-e28.
- Ham L, Dapena I, Moutsouris K, et al. Persistent corneal edema after descemetorhexis without corneal graft implantation in a case of Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea*. 2011;30:248-249.
- Koenig SB. Planned Descemetorhexis without endothelial keratoplasty in eyes with Fuchs corneal endothelial dystrophy. *Cornea*. 2015;34:1149-1151.
- Arbelaez JG, Price MO, Price FW, Jr. Long-term follow-up and complications of stripping descemet membrane without placement of graft in eyes with Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea*. 2014;33:1295-1299.

6. Rao R, Borkar DS, Colby KA, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty after failed Descemet stripping without endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2017;36:763–766.
7. Lee HJ, Muir WM. Eventual endothelial failure after initial corneal clearing after a detached endothelial graft in Fuchs dystrophy. *Cornea*. 2017;36:241–243.
8. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2493–2502.
9. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, et al. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*. 2013;32:1167–1170.
10. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Author response: human corneal endothelium regeneration: effect of ROCK Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:5594–5595.
11. Galvis V, Tello A, Gutiérrez AJ. Human corneal endothelium regeneration: effect of ROCK inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:4971–4973.
12. Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, et al. Effect of the rho-associated kinase inhibitor eye drop (ripasudil) on corneal endothelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:1284–1292.

Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty

Natalia Vázquez,¹ Carlos A. Rodríguez-Barrientos,¹ Salvador D. Aznar-Cervantes,² Manuel Chacón,¹ José L. Cenis,² Ana C. Riestra,¹ Ronald M. Sánchez-Avila,¹ Mairobi Persinal,¹ Agustín Brea-Pastor,³ Luis Fernández-Vega Cueto,¹ Álvaro Meana,¹ and Jesús Merayo-Llodes¹

¹Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Asturias, Spain

²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, Departamento de Biotecnología de La Alberca, Murcia, Spain

³Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica, Universidad de Oviedo, Asturias, Spain

Correspondence: Natalia Vázquez, Instituto Universitario Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, Oviedo 33012, Asturias, Spain; natalia.vazquez@fio.as.

NV and CAR-B contributed equally to the work presented here and therefore should be regarded as equivalent authors.

Submitted: March 2, 2017
Accepted: May 10, 2017

Citation: Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, et al. Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: transplant in a rabbit Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:3357–3365. DOI:10.1167/lovs.17-21797

PURPOSE. Develop a silk fibroin (SF)-based artificial endothelial graft for its use in a rabbit Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK).

METHODS. Human and rabbit artificial corneal endothelial grafts were developed through the culture of human and rabbit corneal endothelial cells (CECs) on SF films. Rabbit artificial SF endothelial grafts were transplanted in a DMEK surgery into a rabbit *in vivo* model.

RESULTS. SF artificial endothelial grafts showed the characteristic endothelial markers: zonula occludens (ZO-1) and Na⁺/K⁺ ATPase. In a rabbit model of DMEK surgery, SF artificial endothelial graft restored the corneal transparency and thickness at 6 week of follow-up. Anterior segment optical coherence tomography revealed the SF graft as a fully integrated component in the corneal tissue, displaying a similar corneal thickness and endothelial cell count when compared with its healthy contralateral cornea. Histologic analysis showed that the SF artificial endothelial graft was attached and integrated on the surface of the corneal stroma without a significant inflammatory reaction, and rabbit CECs consisted in a monolayer that showed their characteristic markers ZO-1 and Na⁺/K⁺ ATPase, suggesting proper intercellular junctions and cellular pump function.

CONCLUSIONS. We have developed SF films with biological properties that supported the growth of rabbit and human CECs, which showed normal morphology and characteristic markers; and with mechanical properties that allowed its use in a DMEK surgery, proving its *in vivo* functionality in a rabbit model of endothelial dysfunction.

Keywords: silk fibroin films, biomaterials, corneal endothelial cells, DMEK

Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) and Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) are two of the most used methods in the treatment of corneal endothelial dysfunction.¹ In these techniques, Descemet's membrane and the endothelial monolayer, or Descemet's membrane with its endothelium and a thin layer of stroma, are transplanted. These procedures have inherent advantages^{1,2} in terms of visual recovery, final visual acuity, and rejection risk compared with penetrating keratoplasty (PK), which involves the replacement of the full thickness of the cornea. Moreover, these types of surgeries are minimally invasive compared with the current PK technique, in which the anterior chamber is exposed to the environment, avoiding the risk of ocular surface complications,^{3–5} suture-related infections,^{6,7} and devastating expulsive haemorrhage intraoperatively or postoperatively.^{8,9}

Despite that DMEK surgery is more complex in graft preparation and handling than other posterior lamellar keratoplasties,¹⁰ it is the most in-demand surgical technique because it does not have the disadvantages of transferring another cell type and offers faster and more complete visual

rehabilitation than DSAEK.^{11–17} However, as in other surgical techniques, it still requires of human donors.

The treatment of corneal pathologies using artificial endothelial grafts¹⁸ or isolated endothelial cells, associated^{19,20} or not²¹ with the use of ROCK kinase, represents a promising future in which there would be less need of human donors when performing surgical interventions. However, cell therapy with injected corneal endothelial cells (CECs) into the anterior chamber may lead to systemic cell dispersion via aqueous flow²⁰ or could lead to secondary glaucoma if the cells obstruct the trabecular meshwork.²² This inherent risk could be avoided by grafting CECs already attached to an artificial Descemet membrane.

In recent years, tissue engineering techniques have been aimed at developing new artificial endothelial grafts, which could supplant the natural endothelium, through optimization of CEC culture techniques^{23–25} and the development of adequate scaffolds that support their growth.^{18,26–40} These scaffolds not only have to offer an adequate environment for CEC growth, moreover, they must be able to be used in the





FIGURE 1. DMEK surgical procedure for SF film transplantation. Descemetorhexis from the posterior stroma (A), injecting SF films with or without rabbit CECs into the anterior chamber (B) and unfolded SF films inside the anterior chamber (C).

current minimally invasive surgical techniques while maintaining endothelial function when they are grafted.

Silk fibroin (SF), the structural protein obtained from the cocoon of the silk worm *Bombyx mori*, has been used in tissue engineering due to optical properties, nonimmunogenic response, controllable degradation rates, and tunable and robust mechanical properties.^{41–48} Several studies have reported SF films as an optimal scaffold for different types of cell cultures.^{49,50} On the ocular surface, SF films also have been shown to be an optimal substrate for the culture of corneal cells.^{42,51,52} All these facts make SF films a good candidate for their use in current surgical techniques.

In the present study, we used SF films for the development of artificial endothelial grafts. These artificial endothelial grafts were transplanted into rabbit corneas using a minimally invasive surgical technique. The tissue-engineered SF endothelial graft restored endothelial function, leading to complete recovery of the corneal transparency and thickness at 6 weeks. Finally, we show that human CECs also can be cultured on SF films, so that SF films may be an alternative for the development of corneal endothelial artificial grafts for its use in a human DMEK surgery.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the SF Films

Bombyx mori cocoons were obtained from silkworms reared in the sericulture facilities of the IMIDA (Murcia, Spain). Cocoons were chopped into 4 or 5 pieces and boiled in 0.02M Na₂CO₃ for 30 minutes to remove the glue-like sericin proteins. Then raw SF was rinsed thoroughly with water and dried at room temperature for 3 days. The extracted SF was dissolved in 9.3M LiBr (Acros Organics, Geel, Belgium) for 3 hours at 60°C to generate a 20% wt/vol solution that was dialyzed against distilled water for 3 days (Snakeskin Dialysis Tubing 3.5 kDa molecular weight cutoff; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with eight total water changes. The resultant 5% wt/vol SF dissolution was

recovered, filtered, and stored at 4°C for no longer than 30 days. SF films were obtained by casting 580 µL 5% wt/vol SF aqueous dissolution on a plastic Petri dish, 5.8 cm in diameter, to give a 10-µm-thick film. Once dried at room temperature, the water-annealing was performed by placing the SF films in a water-filled desiccator in vacuum conditions for 24 hours.

SF films were sterilized in 70% ethanol for 15 minutes and rinsed in a sterile solution of PBS pH 7.4 before cell seeding.

Characterization of Mechanical and Optical Properties of the SF Films

Tensile tests were performed using a universal test frame machine (Qtest; MTS Systems, Eden Prairie, MN, USA). The mechanical properties of specimens (10 × 30 mm) were recorded with a crosshead speed of 0.1 mm/s and a load cell of 5N, under ambient conditions. The thickness of each piece of film was determined with an electronic digital micrometer, with an accuracy of 1 µm. Young's modulus (MPa), ultimate strength (MPa), and elongation at rupture (%) were determined using the stress-strain curves. This study was performed using either dry films or prewet films (in PBS 1X, for 24 hours at room temperature). Each test was performed at least three times per condition.

Light transmission measurements were made using a narrow spectral region between 400 and 700 nm using a SPELEC Spectroelectrochemical Instrument (DropSens, Asturias, Spain) equipped with a Deuterium 215 to 400 nm and Tungsten Halogen 360 to 2500 nm light source and a linear silicon charge-coupled device array with a detection range 200 to 900 nm detector. The entire tests were carried out in duplicate at 20°C ± 0.1°C, using prewet (1X PBS for 24 hours at room temperature) 10-mm-diameter SF films.

For the statistical analyses, IBM SPSS Statistics v.22 software (IBM Corp., New York, NY, USA) was used. Data followed the normality and homogeneity of variance requirements and they were compared by means of the parametric ANOVA test ($P < 0.05$).

Cell Isolation and Culture of CECs on SF Films

CECs were cultured in Optimum I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 8% vol/vol fetal bovine serum,

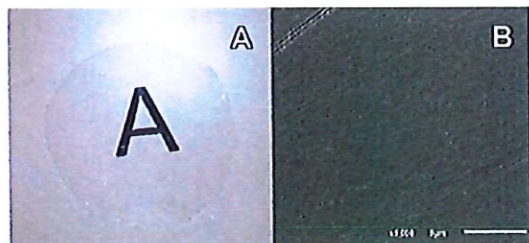


FIGURE 2. Macroscopic view (A) and SEM micrographs (B) of SF films.

TABLE. Mechanical Properties of Dry and Prewet SF Films

	Dry Films	Prewet Films
Young's modulus, MPa	346 ± 33	22 ± 2
Elongation, %	8.3 ± 1.2	23.5 ± 9.1
Ultimate strength, MPa	21.5 ± 3.3	2.1 ± 1.0

Values are shown as mean ± SD.

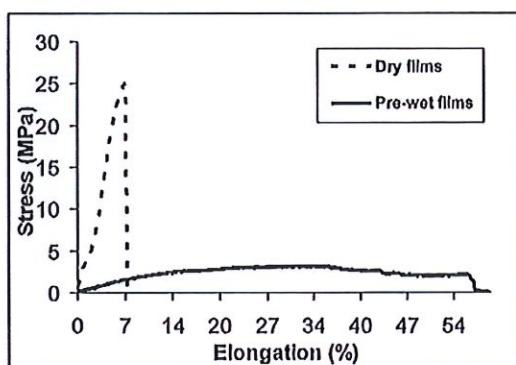


FIGURE 3. Stress-strain curves of dry and prewet SF films.

0.3 mM ascorbic acid 2-phosphate, 200 mg/L calcium chloride, 0.04% chondroitin sulfate, 10 U/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin, 20 ng/mL nerve growth factor (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), and 5 ng/mL epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA).

Culture of Human CECs. Human tissue was handled according to the Declaration of Helsinki. Corneoscleral rings from corneas previously used for PK were obtained from the local Eye Bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Oviedo, Asturias, Spain) and the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo, Asturias, Spain). All tissues were maintained at 4°C in Eusol-C storage medium (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Italy) for fewer than 10 days before use.

Corneoscleral rings were placed endothelial side up in a Petri dish containing endothelial culture medium. Descemet's membrane, along with endothelial cells, was carefully dissected under a dissecting stereomicroscope following the Schwalbe line and the peripheral endothelial ring was maintained overnight at 37°C in a culture plate (2 cm²), previously treated with FNC Coating Mix (Athena Environmental Sciences, Baltimore, MD, USA), with 1 mL culture medium. The following day, the excess medium was removed to a volume of 150 µL and then, the peripheral endothelial ring was placed as an explant in the culture plate.

Culture of Rabbit CECs. Rabbit CECs were isolated from healthy male New Zealand white rabbits (2 months of age and body weight of 2.0–2.5 kg) obtained from the Animal Housing Facility of the University of Oviedo (Oviedo, Asturias, Spain). All animals were treated in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The protocols were approved (PROAE 14/2014) by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Oviedo and the Animal Production and Health

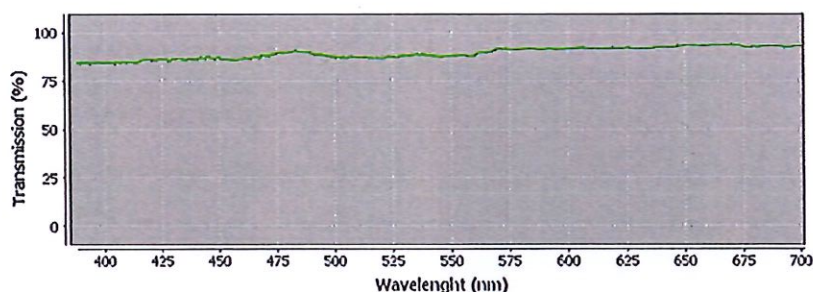


FIGURE 4. Optical properties (% light transmission) of SF films.

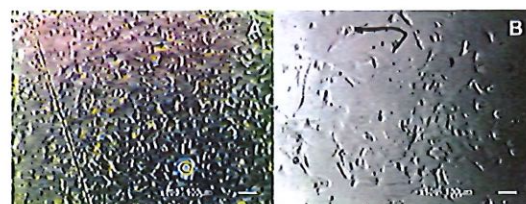


FIGURE 5. Micrographs of human CECs cultured on SF films with (A) or without (B) pretreatment with FNC Coating Mix.

Service of Asturias. Rabbits were kept under a 12/12 day/night light cycle with food and water ad libitum and were monitored on a daily basis.

Descemet's membrane along with endothelial cells were carefully peeled and digested with trypsin/EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich Corp.) for 30 minutes at 37°C. After that, the trypsin was neutralized with culture medium. The loosened cells were centrifuged using an Eppendorf 5702R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 0.4g for 10 minutes, and the supernatant was removed. Fresh medium was added and the cells were seeded on a culture plate (10 cm²) previously treated with FNC Coating Mix.

Culture of CECs on SF Films. When human or rabbit cultures were confluent, cells were digested with Accutase (Sigma-Aldrich). The loosened cells were centrifuged using an Eppendorf 5702R centrifuge at 0.4g for 10 minutes and the supernatant was removed. Fresh medium was added and the cells were seeded (100,000 cells/cm²; passage 1) on one of the sides of a SF film, previously treated with FNC Coating Mix, being cultured for a week in an 11-mm-diameter culture device.⁵³

All cells were cultured under the same conditions (humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, medium changed three times per week).

Examination of Cell Cultures

Cellular growth was assessed using a Leica DMIL LED phase-contrast microscope (Leica, Wentzler, Germany); photos were taken with an attached EC3 camera (Leica).

Confluent cultures on SF films were fixed using ice-cold methanol for 10 minutes, an 8.5-mm-diameter punch was performed and used for phase-contrast microscopy, immunocytochemistry, and scanning electron microscopy (SEM).

Methanol fixed cultures were rinsed with PBS solution twice for 10 minutes and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton-X 100 for another 10 minutes. Next, the samples were incubated with primary antibody containing 10% normal goat serum (Abcam, Cambridge, UK) at 4°C overnight. Mouse Na⁺/K⁺ ATPase (Millipore, Billerica, MA, USA) (1:100)

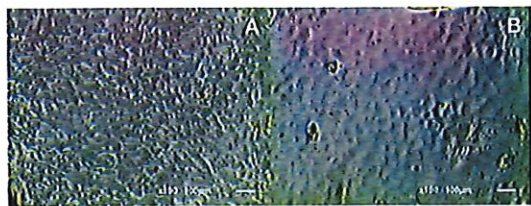


FIGURE 6. Micrographs of rabbit CECs cultured on SF films with (A) or without (B) pretreatment with FNC Coating Mix.

and rabbit zonula occludens-1 (ZO-1) (Life Technologies) (1:100) double immunostains were performed to confirm their phenotype. Subsequently, the samples were incubated with corresponding secondary antibodies (Life Technologies) (1:500) for 2 hours at room temperature. Between incubations, samples were washed three times with PBS for 10 minutes. Immunolabeled cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole to allow nuclei visualization. All the samples were examined using a Leica DM6000B fluorescence microscope.

Surface morphology of cultured and noncultured SF films was examined by SEM. Cultured and noncultured SF films fixed in ice-cold methanol were rinsed in PBS, followed by dehydration through a graded series of acetone (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%) for 10 minutes, respectively, and dried by the critical-point method. Afterward, they were coated with gold under vacuum and observed with a JEOL 6610LV scanning electron microscope (JEOL Co., Tokyo, Japan) at 20 kV accelerated voltage.

Transplantation of SF Films in a Rabbit Model

DMEK surgery was performed unilaterally on six New Zealand white rabbits. Rabbits were divided into three groups: rabbits transplanted with SF films with ($n = 2$) or without ($n = 2$) cultured rabbit CECs and rabbits with only peeled off Descemet's membranes ($n = 2$).

Animals were anesthetized with buprenorphine and meloxicam, and then intubated and ventilated with isoflurane 2%. After topical administration of double anesthetic Colicursi (tetracaine 0.1% and oxybuprocaine 0.4%), a 4-mm wound incision was made at the limit of the corneoscleral tissue of each right eye with a slit knife, and the corneal endothelium was removed from the anterior chamber with a 30-gauge needle. SF films with or without rabbit CECs were cut using an 8.5-mm-diameter trephine and stained with trypan blue solution. Grafts of SF films, as a half-rolled taco with CECs facing inward, were placed in a disposable inserting set for Descemet lenticle with a small volume of viscoelastic agent (E. Janach, Como, Italy), injected and unfolded into the anterior chamber and fixed to the posterior stroma stripped of Descemet's membrane (Fig. 1). The corneoscleral wound was closed with nylon sutures and a subconjunctival dose of Trigon Depot (triamcinolone acetonide 40 mg/mL) was administered.

After transplantation, rabbits were treated with Tobradex (dexamethasone 1 mg/mL + tobramycin 3 mg/mL) and Timabak (timolol 2.5 mg/mL) eye drops twice a day during the follow-up period. The exterior appearance of rabbit eyes was monitored by taking photographs on the day of surgery, 24 hours after surgery, and once a week for the duration of the experiment. Six weeks after transplantation, corneal thickness was measured by anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) using an OCT CASIA SS-100 (Tomey, Erlangen, Germany) and a corneal endothelial count was performed using a specular microscope SP-2000P (TOPCON, Tokyo,

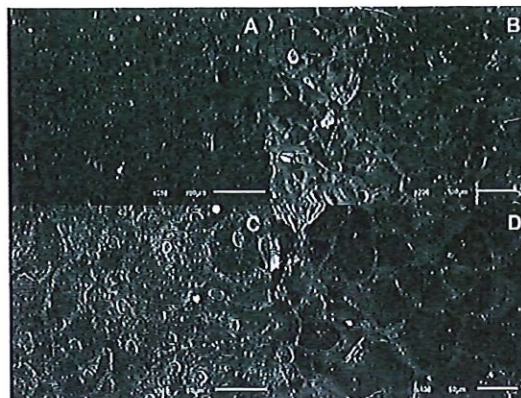


FIGURE 7. SEM micrographs of human CECs (A, C) or rabbit CECs (B, D) cultured on SF films pretreated with FNC Coating Mix.

Japan). Finally, rabbits were euthanized by an intravenous overdose of pentobarbital sodium.

Corneas were excised, rinsed with PBS solution, and fixed using ice-cold methanol for 4 hours. Corneal tissues were embedded in paraffin and then, hematoxylin-eosin stain and immunostaining against ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase was performed as described in the previous section.

RESULTS

Preparation of the SF Films

SF films were obtained by evaporating the SF dissolution extracted from cocoons of *Bombyx mori* after removing the glue-like sericin proteins. Fabricated films had an average area of 3.46 cm^2 and thickness of $10 \mu\text{m}$ showing a smooth surface when observed under SEM (Fig. 2).

Characterization of Mechanical and Optical Properties of the SF Films

Average values of Young's modulus, the elongation at break, and the ultimate strength were calculated using stress-strain curves generated from tensile tests and are shown in the Table. All were found to be statistically different depending on the hydration of the film (ANOVA, $P < 0.05$).

As can be observed in the Table, the average value of Young's modulus was much higher in dry films (346 MPa) than in prewet films (22 MPa), with the latter being less rigid. The elongation was improved with the hydration of the films, with average values of 8.3% and 23.5% in dry and prewet films, respectively (Fig. 3). Otherwise, the estimated ultimate

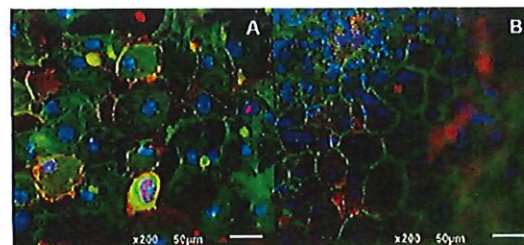


FIGURE 8. Micrographs of human (A) and rabbit (B) CECs cultured on SF films. ZO-1 (green) and Na^+/K^+ ATPase (red).



FIGURE 9. Photographs of the exterior appearance of transplanted rabbit eyes during the follow-up period. From top to bottom: rabbits transplanted with or without rabbit CECs cultured on SF films and rabbits with only peeled Descemet's membrane.

strength decreased from 21.5 MPa to 2.1 MPa after prewetting the films.

Optical testing revealed (Fig. 4) that SF films were optically transparent at all wavelengths of the visible light electromagnetic spectrum with a mean value of light transmission of $89.447\% \pm 0.84\%$.

Cell Isolation, Culture, and Examination of CECs on SF Films

Human CECs were observed to have migrated from the explant onto the plate after 3 to 4 days in culture, and by day 30 a monolayer of compact cells had formed on the plate immediately adjacent to the explant. These cells displayed their typical hexagonal endothelial morphology. After 30 days, confluent ($80,000 \text{ cell/cm}^2$) hexagonal human CECs were detached by Accutase digestion, and subcultured for a week on SF films previously treated with FNC Coating Mix. Without this

treatment, human CECs showed signs of endothelial-mesenchymal transition with an elongated and fibroblast-like abnormal phenotype (Fig. 5).

In the same way, rabbit CECs were able to attach and proliferate until confluence ($150,000 \text{ cells/cm}^2$) when isolated by trypsin/EDTA digestion. In this case, when rabbit CECs were subcultured for a week on SF films, treatment with FNC improved morphology of rabbit CECs only slightly (Fig. 6).

These results were confirmed under SEM, whereby human and rabbit CECs displayed their polygonal morphology when they were cultured on SF films previously treated with FNC Coating Mix (Fig. 7).

Immunohistochemical analysis revealed positive staining for ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase, a tight junction-associated protein and an integral membrane protein, respectively, characteristic markers of CECs and responsible for endothelial barrier and pump functions (Fig. 8).

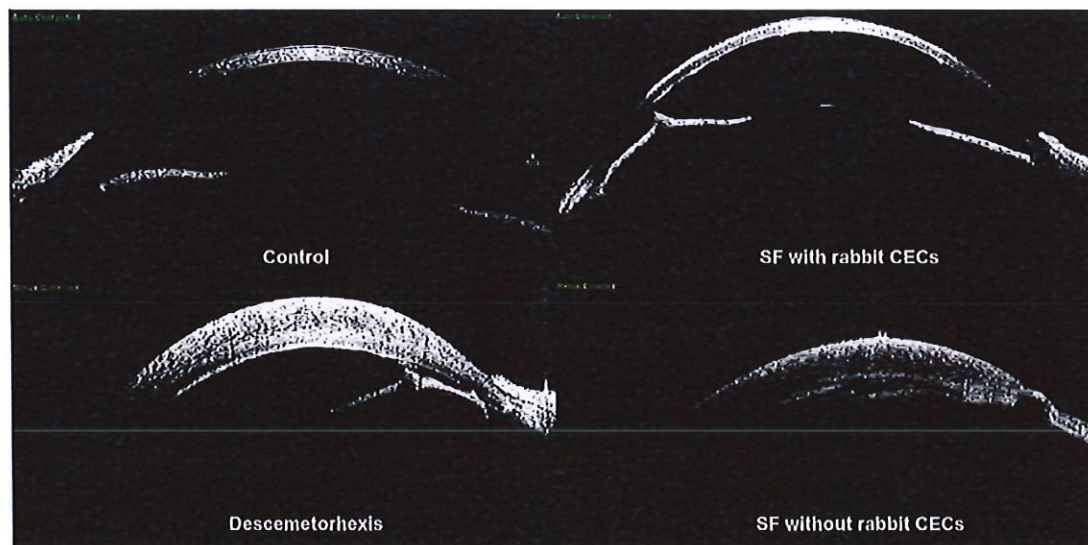


FIGURE 10. AS-OCT of control, descemetorhexis, and transplanted rabbit corneas displaying corneal thickness at 6 weeks.

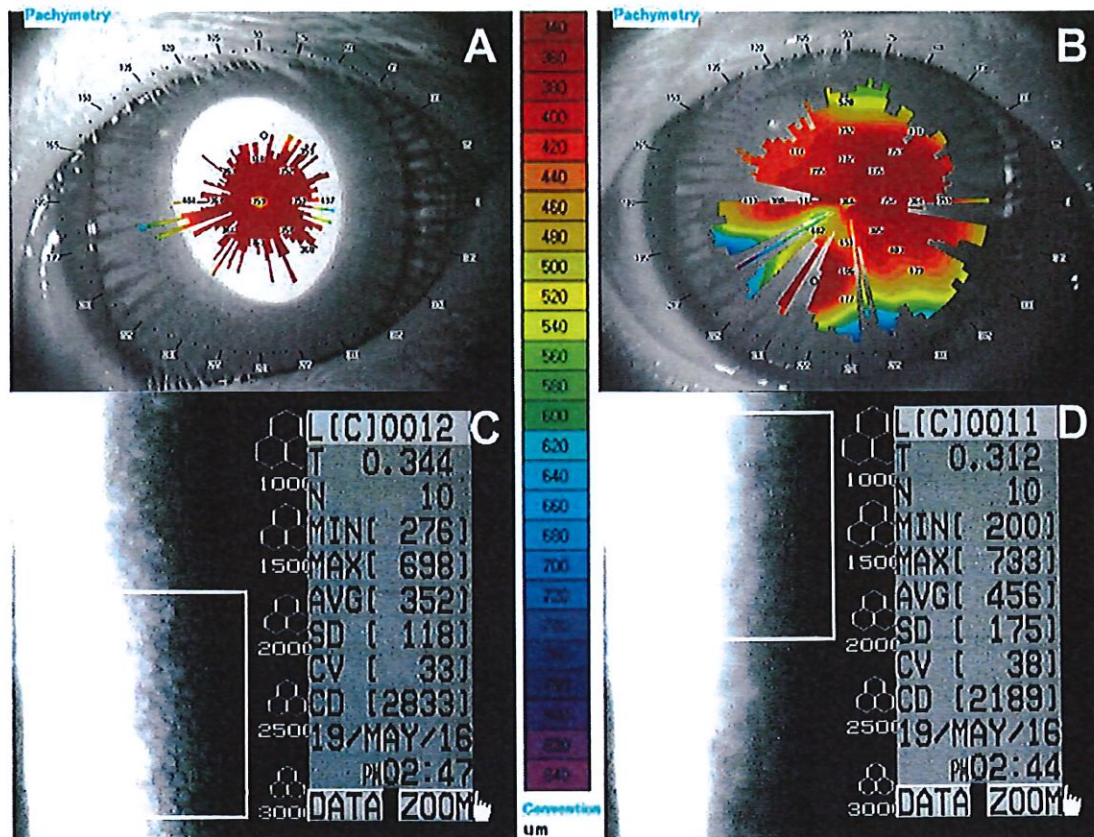


FIGURE 11. Corneal pachymetry (A, B) and CEC count (C, D) of contralateral control rabbit eye (A, C) and transplanted rabbit eye with rabbit CECs cultured on SF films (B, D).

Transplantation of SF Films in a Rabbit Model

Corneal edema and white turbidity appeared a few days after surgery in the three groups: rabbits transplanted with or without rabbit CECs cultured on SF films and rabbits with only peeled Descemet's membrane. Corneas transplanted with cultured rabbit CECs on SF films began to become transparent by day 15, and corneal transparency was maintained up to 6 weeks. However, the eyes in the group without rabbit CECs cultured on SF films and the eyes in the group of rabbits with peeled off Descemet's membrane did not restore corneal transparency and retained the corneal edema during the follow-up period. No obvious signs of immune rejection were found in any group (Fig. 9).

Results of AS-OCT revealed SF films with cultured rabbit CECs as a fully integrated component in the corneal tissue, displaying a similar corneal thickness when compared with its healthy contralateral cornea. SF films without cultured rabbit CECs and rabbits with peeled off Descemet's membrane revealed only an enhancement in corneal thickness reflecting a loss of corneal endothelial functionality (Fig. 10).

Topography mapping of transplanted corneas revealed irregular values of peripheral corneal thickness (392–477 μm), whereas central cornea appeared homogeneous (366 μm) in corneas with cultured rabbit CECs, displaying a similar distribution when compared with its healthy contralateral cornea (359 μm) (Fig. 11). Moreover, the CECs count in eyes transplanted with cultured rabbit CECs on SF films had a

number of cells with a size and shape similar to the ones found in the contralateral control eye (Fig. 11).

The histologic analysis showed a slightly marked fibrotic tissue in the posterior segment of the stroma in rabbits transplanted with SF films without cultured rabbit CECs and an apparent corneal edema and fibrotic tissue in the rabbits with peeled off Descemet's membrane. SF films, in rabbits transplanted with cultured cells, was attached tightly to the corneal stroma, and rabbit CECs formed a continuous monolayer with the same morphology and phenotypical markers, ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase, as a healthy control eye (Fig. 12). No sign of endothelia remains were found in any of the transplanted corneas.

DISCUSSION

Currently, corneal transplantation from cadaveric donors is the main alternative for the treatment of endothelial dysfunctions.² However, this procedure is limited by the shortage of high-quality donor corneas.¹⁰ Due to recent advances in the field of biomaterials and the culture of CECs, the development of artificial endothelial grafts could be an alternative to traditional surgeries.

In this study, we have isolated SF from cocoons of *Bombyx mori* and manufactured it into 10-μm-thick transparent films that support human and rabbit CEC growth. Madden et al.⁵² were the first to prepare 5-μm thick SF transparent films, modified with coatings of collagen IV, FNC Coating Mix, and

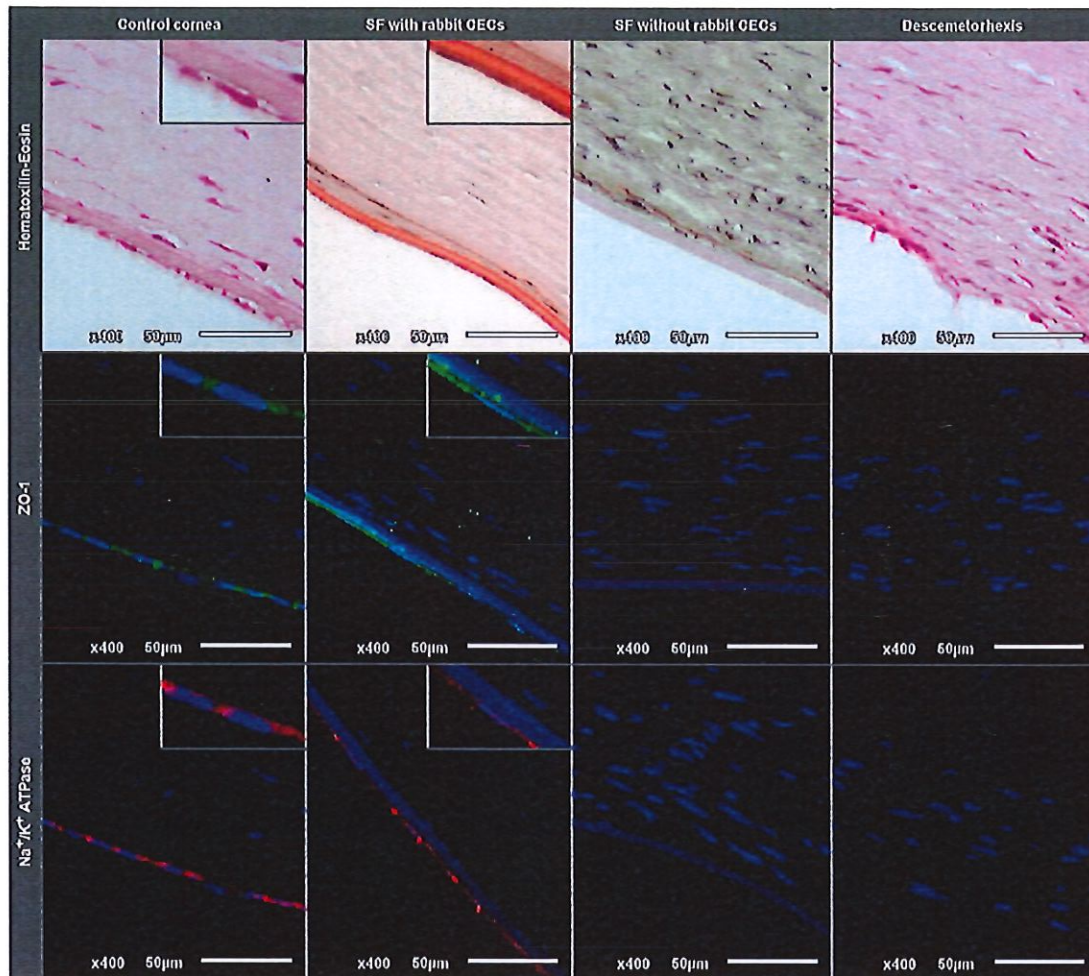


FIGURE 12. Histologic and immunofluorescent analysis after SF film transplantation.

chondroitin sulfate laminin mixture to assess cell attachment and proliferation of the B4G12 cell line and primary culture of human CECs. The group achieved successful cell confluence and proliferation with the collagen coating, concluding that SF films could be a potential substratum for the transplantation of artificial endothelial grafts for keratoplasty. In our case, the treatment of SF films with FNC Coating Mix allowed the growth of both rabbit and human CECs, maintaining the hexagonal morphology and the expression of its characteristic markers ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase.

The second outcome of this study was that SF films have mechanical properties that permit their use in a disposable inserting set for Descemet lenticle. Our SF prewet films showed a Young's modulus value of 22 MPa and an ultimate strength of 2.1 MPa. These values are similar to the values of posterior corneal stroma described in the literature⁵⁴ and allowed that SF films were easily handled for transplantation into rabbit eyes in a DMEK model. Our SF artificial graft was able to fold in the interior of a disposable inserting set for Descemet lenticle, and was easily introduced and unfolded in the anterior chamber in a DMEK surgical procedure, indicating that it could be used in this type of surgery. This point is important in corneal regenerative medicine because a tissue-

engineered endothelium should be able to adapt to the current surgical procedures, avoiding the need for the development of new grafting techniques, and, therefore, making it easier to implement in the clinical practice.

In our study, we established a 6-week follow-up period. Throughout this follow-up period, it was observed that transplanted corneas with cultured rabbit CECs on SF films began to become transparent by day 15 and corneal transparency was maintained up to 6 weeks. Results of AS-OCT revealed SF films with rabbit CECs as a fully integrated component in the corneal tissue, displaying a similar average corneal thickness when compared with their healthy contralateral cornea. Although CEC density was found to be lower in the rabbits transplanted with SF films with cultured CECs, the density of CECs seems adequate because it restored corneal transparency.

It is known that rabbit CECs have the ability to proliferate both *in vivo* and *in vitro*.⁵⁵ However, in rabbits transplanted with SF films without rabbit CECs and in rabbits with peeled off Descemet's membrane only, the cornea remained edematous during the entire follow-up period and the corneal thickness was greater than that of the healthy contralateral cornea. These findings indicate that corneal transparency, at

the 6-week follow-up period, is due to SF artificial endothelial graft and not due to spontaneous regeneration of autologous rabbit endothelium.

Histologic staining showed that the SF artificial endothelial graft was attached and integrated in the corneal stroma without a significant inflammatory reaction, and rabbit CECs consisted of a monolayer that showed their characteristic markers ZO-1 and Na⁺/K⁺ ATPase, suggesting proper intercellular junctions and cellular pump function. These results confirmed that the SF artificial endothelial graft performs as expected on in vivo implantation and contributes to the maintenance of corneal clarity.

Several groups, including our own,⁵⁶ have already developed different artificial endothelial grafts that allow the recovery of endothelial functionality in different in vivo models.^{18,27,29,57,58} From our point of view, SF films present several advantages, such as having better mechanical properties than other biomaterials, being a biomaterial that has been used for centuries in medicine and that could be easily accessible and have a lower cost of production than other biomaterials in some countries. However, future studies with more animals and a longer follow-up period will be necessary to elucidate the ideal biomaterial for this purpose.

Our current results still have some issues to resolve. On the one hand, the number of animals was limited, and on the other hand the differences in the size of anterior chamber and the IOP between rabbits and humans make rabbit DMEK surgery even a more complex procedure, limiting the correct placing and unfolding of the graft. In our case, pachymetry and AS-OCT revealed some irregular values of corneal thickness in the peripheral cornea. Several studies⁵⁹⁻⁶¹ have demonstrated that the presence of anomalies, such as folds or wrinkles in the graft, secondary to posterior keratoplasties, could compromise visual acuity. However, this limitation could be overcome with an appropriate handling of the graft.

In conclusion, we developed SF films with biological properties that supported the growth of rabbit CECs, which expressed its normal morphology and characteristic markers; and with mechanical properties that allowed its use in a DMEK surgery, proving its in vivo functionality in a rabbit model of endothelial dysfunction. Furthermore, clinical translation to human therapies might be feasible because, as shown, human CECs also can be cultured on SF films.

Acknowledgments

The authors thank the diagnostic team from the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega for their skillful technical assistance.

Supported by Programa INNPACTO (IPF-2012-1029-010000).

Disclosure: N. Vázquez, None; C.A. Rodríguez-Barrientos, None; S.D. Aznar-Cervantes, None; M. Chacón, None; J.L. Cenís, None; A.C. Riestra, None; R.M. Sánchez-Avilla, None; M. Persinal, None; A. Brea-Pastor, None; L. Fernández-Vega Cueto, None; Á. Meana, None; J. Merayo-Llodes, None

References

- Price MO, Price FW Jr. Endothelial keratoplasty - a review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2010;38:128-140.
- Tan DTH, Dart JKG, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet*. 2012;379:1749-1761.
- Mannis MJ, Zadnik K, Miller MR, Marquez M. Preoperative risk factors for surface disease after penetrating keratoplasty. *Cornea*. 1997;16:7-11.
- Meyer RE, Bobb KC. Corneal epithelium in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1980;90:142-147.
- Thompson RW, Price MO, Bowers PJ, Price FW. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2003;110:1396-1402.
- Christo CG, van Rooij J, Geerards AJ, Remcifer I, Beekhuis WH. Suture-related complications following keratoplasty: a 5-year retrospective study. *Cornea*. 2001;20:816-819.
- Forstot SL, Abel R, Binder PS. Bacterial endophthalmitis following suture removal after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1975;80:509-512.
- Price FW, Whitson WE, Ahad KA, Tavakkoli H. Suprachoroidal hemorrhage in penetrating keratoplasty. *Ophthalmic Surg*. 1994;25:521-525.
- Purcell JJ Jr, Krachmer JH, Doughman DJ, Bourne WM. Expulsive hemorrhage in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1982;89:41-43.
- Rajan MS. Surgical strategies to improve visual outcomes in corneal transplantation. *Eye (Lond)*. 2014;28:196-201.
- Guerra FP, Anshu A, Price MO, Giebel AW, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective study of 1-year visual outcomes, graft survival, and endothelial cell loss. *Ophthalmology*. 2011;118:2368-2373.
- Guerra FP, Anshu A, Price MO, Price FW. Endothelial keratoplasty: fellow eyes comparison of descemet stripping automated endothelial keratoplasty and Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2011;30:1382-1386.
- Kruse FE, Schrehardt US, Tourtas T. Optimizing outcomes with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014;25:325-334.
- Melles GRJ, Lander F, Rietveld IJR. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*. 2002;21:415-418.
- Melles GRJ, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea*. 2006;25:987-990.
- Price MO, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013;24:329-335.
- Tourtas T, Laaser K, Bachmann BO, Cursiefen C, Kruse FE. Descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:1082-1090.
- Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2992-2997.
- Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol*. 2012;181:268-277.
- Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep*. 2016;6:26113.
- Mimura T, Shimomura N, Usui T, et al. Magnetic attraction of iron-endocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Exp Eye Res*. 2003;76:745-751.
- Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Long-term outcome of iron-endocytosing cultured corneal endothelial cell transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res*. 2005;80:149-157.
- Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res*. 2004;78:573-578.
- Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:660-667.
- Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1626-1631.

26. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea*. 2001;20:731-737.
27. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:800-806.
28. Islam MM, Cepla V, He C, et al. Functional fabrication of recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels for regenerative medicine applications. *Acta Biomater*. 2015;12:70-80.
29. Jumbblatt MM, Maurice DM, Schwartz BD. A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation*. 1980;29:498-499.
30. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:4519-4526.
31. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea*. 2008;27:548-555.
32. Lai J-Y, Chen K-H, Hsueh G-H. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation*. 2007;84:1222-1232.
33. Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg*. 1993;19:232-235.
34. McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD. Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology*. 1980;87:194-201.
35. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000;6:307-319.
36. Ozelcik B, Brown KD, Blencowe A, Daniell M, Stevens GW, Qiao GG. Ultrathin chitosan-poly(ethylene glycol) hydrogel films for corneal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013;9:6594-6605.
37. Schwartz BD, McCulley JP. Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20:467-480.
38. Yoerueck E, Saygılı O, Spitzer MS, Tatar O, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2009;28:416-420.
39. Yoshida J, Oshikata-Miyazaki A, Yokoo S, Yamagami S, Takezawa T, Amano S. Development and evaluation of porcine atelocollagen vitrigel membrane with a spherical curve and transplantable artificial corneal endothelial grafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:4975-4981.
40. Zhang J, Sisley AMG, Anderson AJ, Taberner AJ, McGhee CNJ, Patel DV. Characterization of a novel collagen scaffold for corneal tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;22:1-28.
41. Arai T, Freddi G, Innocenti R, Tsukada M. Biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin fibers and films. *J Appl Polym Sci*. 2004;91:2383-2390.
42. Chirila T, Barnard Z, Zainuddin, Harkin DG, Schwab IR, Hirst L. *Bombyx mori* silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders. *Tissue Eng A*. 2008;14:1203-1211.
43. Jin HJ, Park J, Karageorgiou V, et al. Water-stable silk films with reduced beta-sheet content. *Adv Funct Mater*. 2005;15:1241-1247.
44. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2005;26:147-155.
45. Motta A, Fambri I, Migliarese C. Regenerated silk fibroin films: thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromol Chem Phys*. 2002;203:1658-1665.
46. Panlaitis B, Altman GH, Chen J, Jin HJ, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. 2003;24:3079-3085.
47. Shao Z, Vollrath F. Materials: surprising strength of silkworm silk. *Nature*. 2002;418:741-741.
48. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci*. 2007;32:991-1007.
49. Ghassemifar R, Redmond S, Zainuddin, Chirila TV. Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes. *J Biomater Appl*. 2010;24:591-606.
50. Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. 2006;27:6064-6082.
51. Chirila T, Barnard Z, Zainuddin, Harkin D. Silk as substratum for cell attachment and proliferation. *Materials Science Forum*. 2007;561-565:1549-1552.
52. Madden PW, Lai JN, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials*. 2011;32:4076-4084.
53. Vazquez N, Chacón M, Meana A, et al. Keratin-chitosan membranes as scaffold for tissue engineering of human cornea. *Histol Histopathol*. 2015;30:813-821.
54. Lombardo M, Lombardo G, Carbone G, de Santo MP, Barberi R, Serrao S. Biomechanics of the anterior human corneal tissue investigated with atomic force microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:1050-1057.
55. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 2012;95:68-75.
56. Vázquez N, Chacón M, Rodríguez-Barrientos CA, et al. Human bone derived collagen for the development of an artificial corneal endothelial graft. In vivo results in a rabbit model. *PLoS One*. 2016;11:e0167578.
57. Fan T, Ma X, Zhao J, et al. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models. *Mol Vis*. 2013;19:400-407.
58. Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res*. 2004;79:231-237.
59. Muftuoglu O, Prasher P, Bowman RW, McCulley JP, Mootha VV. Corneal higher-order aberrations after Descemet's stripping automated. *Ophthalmology*. 2010;117:878-884.e6.
60. Pantanelli SM, Sabesan R, Ching SST, Yoon G, Hindman HB. Visual performance with wave aberration correction after penetrating, deep anterior lamellar, or endothelial keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:4797-4804.
61. Seery LS, Nau CB, McLaren JW, Baratz KH, Patel SV. Graft thickness, graft folds, and aberrations after descemet stripping endothelial keratoplasty for fuchs dystrophy. *Am J Ophthalmol*. 2011;152:910-916.

RESEARCH ARTICLE

Human Bone Derived Collagen for the Development of an Artificial Corneal Endothelial Graft. *In Vivo* Results in a Rabbit Model

Natalia Vázquez^{1*}, Manuel Chacón¹, Carlos A. Rodríguez-Barrientos¹, Jesús Merayo-Llotes¹, Miguel Naveiras¹, Begoña Baamonde^{1,2}, Jose F. Alfonso¹, Irlana Zambrano-Andazoi¹, Ana C. Riestra¹, Álvaro Meana^{1,3}

1 Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo (Spain), 2 Hospital Universitario Central de Asturias (Spain), 3 CIBER on rare disease—CIBERer, Instituto de Investigaciones Sanitarias de la Fundación Jiménez Díaz—IIS-FJD (Spain)

* natalia.vazquez@fio.as



OPEN ACCESS

Citation: Vázquez N, Chacón M, Rodríguez-Barrientos CA, Merayo-Llotes J, Naveiras M, Baamonde B, et al. (2016) Human Bone Derived Collagen for the Development of an Artificial Corneal Endothelial Graft. *In Vivo* Results in a Rabbit Model. PLoS ONE 11(12): e0167578. doi:10.1371/journal.pone.0167578

Editor: Alexander V. Ljubimov, Cedars-Sinai Medical Center, UNITED STATES

Received: June 23, 2016

Accepted: November 16, 2016

Published: December 1, 2016

Copyright: © 2016 Vázquez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Fundación Mutua Madrileña, Government of Asturias (FEDER-EU - FC-15-GRUPIN 14-141) and Telefónica. The funders had no role in the study design, data collection analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Corneal keratoplasty (penetrating or lamellar) using cadaveric human tissue, is nowadays the main treatment for corneal endothelial dysfunctions. However, there is a worldwide shortage of donor corneas available for transplantation and about 53% of the world's population have no access to corneal transplantation. Generating a complete cornea by tissue engineering is still a tough goal, but an endothelial lamellar graft might be an easier task. In this study, we developed a tissue engineered corneal endothelium by culturing human corneal endothelial cells on a human purified type I collagen membrane. Human corneal endothelial cells were cultured from corneal rims after corneal penetrating keratoplasty and type I collagen was isolated from remnant cancellous bone chips. Isolated type I collagen was analyzed by western blot, liquid chromatography-mass spectrometry and quantified using the exponentially modified protein abundance index. Later on, collagen solution was casted at room temperature obtaining an optically transparent and mechanically manageable membrane that supports the growth of human and rabbit corneal endothelial cells which expressed characteristic markers of corneal endothelium: zonula occludens-1 and Na⁺/K⁺ ATPase. To evaluate the therapeutic efficiency of our artificial endothelial grafts, human purified type I collagen membranes cultured with rabbit corneal endothelial cells were transplanted in New Zealand white rabbits that were kept under a minimal immunosuppression regimen. Transplanted corneas maintained transparency for as long as 6 weeks without obvious edema or immune rejection and maintaining the same endothelial markers that in a healthy cornea. In conclusion, it is possible to develop an artificial human corneal endothelial graft using remnant tissues that are not employed in transplant procedures. This artificial endothelial graft can restore the integrality of corneal endothelium in an experimental model of endothelial dysfunction. This strategy could supply extra endothelial tissue and compensate the deficit of cadaveric grafts for corneal endothelial transplantation.

Introduction

Corneal transplantation is the main treatment for patients suffering corneal endothelial dysfunctions. Nevertheless, an important problem in several countries of the world is the shortage of donors, and about 53% of the world's population have no access to corneal transplantation [1]. New therapeutic approaches have been appeared in recent years. Medical treatment with ROCK kinase inhibitor [2] and cell therapies associated with ROCK kinase inhibitor [3] are currently being evaluated. Despite the promise of these new therapeutics, keratoplasty from corneal cadaveric donors remains the gold standard for endothelial diseases.

Penetrating keratoplasty (PK) has traditionally been the treatment of choice for eyes with a damaged endothelial layer such as in Fuchs' endothelial dystrophy or in pseudophakic bullous keratopathy. However, there are several drawbacks with regard to PK such as graft rejection, suture-related problems, infection and astigmatism. New surgical options, such as Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) or Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK), have become increasingly popular since they tend to optimize corneal resources by replacing only the damaged part of the cornea [4–7]. These new techniques require even better endothelial quality in order to perform the corneal graft (cell density, hexagonality ratio, etc), so only 30–35% of the corneas are suitable for lamellar endothelial keratoplasty [8].

A DMEK graft consists of a monolayer of corneal endothelial cells (CECs) on its Descemet's membrane. Reproducing this structure by tissue engineering techniques requires a scaffold that mimics the Descemet's membrane and a source of cells capable of restoring the endothelial function, reflecting two critical determinants for a successful tissue engineered product: the *in vitro* culture of human CECs and the development of a scaffold that provides the appropriate environment for cells.

Human CECs are considered as non-proliferative *in vivo*, since they are arrested in G1 phase [9,10]. Therefore the number of human CECs decreases with age [11] and in several diseases such as endothelial dystrophy, glaucoma, or cataract surgery [12,13]. On the other hand, several studies have shown that human CECs can be induced to divide to a limited extent *in vitro* [14] so that expansion of cultured human CECs could potentially allow many patients to be treated using one donor, decreasing some of the current donor shortage problems.

Different carriers have been used as scaffold for endothelial tissue engineering such as denuded Descemet's membrane [15,16], amniotic membrane [17], gelatin membrane [18–21], anterior lens capsule [22], silk fibroin membrane [23], and different synthetic polymers [24]. In recent years, several groups have been using natural [25–27] or recombinant [28] collagen scaffolds for the culture of human CECs, being porcine [29] or bovine [30,31] type I collagen the most widely used.

Type I collagen is the most abundant protein constituting approximately 25 to 30% of all proteins of human body [32]. It is also an important component of all connective tissues of the body: muscle, teeth, bone and skin [33]. A natural source of type I collagen is cancellous bone [34]. Human cancellous bone is the second most processed, distributed and grafted tissue worldwide, coming right after blood transfusion [35]. The remnant cancellous bone generated during the preparation of bone chips could be a new safe source of human type I collagen.

Culturing human CECs is not an easy task since most of the corneas are used for tissue transplant and those that are discarded have a limited cell density. During corneal transplant, peripheral Descemet's membrane is usually discarded and only its central button is used for graft applications. The unused endothelial tissue may be used in regenerative medicine for the development of a tissue-engineered endothelium since they come from an optimal cell source.

The aim of this study was the development of a new approach for endothelial tissue engineering using products normally processed in tissue banks: remnants of human cancellous

bone chips and Descemet's peripheral rings of corneas previously used for PK. With this approach we were able to produce an artificial corneal endothelial graft, using human purified type I collagen membranes (HPCM) with confluent human and rabbit CECs expressing characteristic corneal endothelial markers. Finally, this artificial lamellar endothelium was grafted in an experimental rabbit model to restore an endothelial dysfunction, leading to complete recovery of corneal transparency and thickness at 6 weeks.

Materials and Methods

Donors

Human tissue was handled according to the Declaration of Helsinki. Corneal tissue and fresh human cancellous bone were obtained, stored and processed at the Asturias regional tissue bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Oviedo, Asturias, Spain) according to Spanish laws.

Collagen type I isolation and quantification

Collagen isolation was performed as previously described [36]. Briefly, 10 cancellous bone chips samples (between 5 and 15cm³ of bone) were received from the local tissue bank and stored at -80°C until use.

Cancellous bone chips were milled and demineralized using an adaptation of a previously reported method [37]. In brief, the granules were demineralized under agitation (300rpm) in 0.5N HCl (25ml/g of bone) at room temperature for 24h. After demineralization the resultant material was rinsed with distilled water. The lipids in the demineralized powder were then rinsed out under agitation with a 1:1 mixture of chloroform and methanol for 1h at room temperature and then repeatedly rinsed, first in methanol and then, in distilled water. The material was then freeze-dried in a Lyoquest -85° Eco (Telstar, Tokyo, Japan) and stored at -80°C until required.

A previously reported pepsin digestion and solubilization technique [38] was employed for the isolation of type I collagen. Lyophilized samples were digested in a 100ml/g 0.01N HCl solution containing 1mg/ml pepsin (Sigma-Aldrich, MO, USA). The suspension was agitated at room temperature for 96h, centrifuged at 10,000xg for 30 minutes, the precipitate discarded, and then aliquoted and stored at -80°C until required.

The collagen concentration was determined using a hydroxyproline assay kit (Sigma-Aldrich, MO, USA). The hydroxyproline content of pepsin digested collagen was determined by the oxidized hydroxyproline with 4-(Dimethylamino)benzaldehyde (DMAB) reaction, which results in a colorimetric (560nm) product, proportional to the hydroxyproline present. The total collagen content (mg/ml) of the digests was determined using the relationship that hydroxyproline forms 14% of total collagen [39].

Gel electrophoresis and western-blot

Electrophoresis was carried out as described by Laemmli [40], using 8% separating gels, which were 1.5mm thick. Samples containing 20.7µg purified collagen and human commercial collagen (Millipore, MA, USA) as control were boiled at 100°C for 5 minutes prior to gel loading. Gels were electrophoresed at 100V (constant voltage) followed by transfer onto a polyvinylidene fluoridemembrane (PVDF, 120V, 40 minutes). After transfer, PDVF membranes were immunoblotted with anti-type I collagen antibody (1:200), and 10% normal goat serum (Abcam, Cambridge, UK) as a blocking agent, overnight at 4°C. Proteins were visualized using a Fusion FX7 chemiluminescence detection system (VilberLourmat, Torcy, France).

Collagen purity assessment

For purity assessment, six random samples were analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS).

Samples were incubated at room temperature with ammonium bicarbonate (50mM, final volume of 50µl) in 8M urea. After 30 minutes 4µl of dithiothreitol (DTT, 200mM in 50mM ammonium bicarbonate) was added and incubated at room temperature for 60 minutes, followed by incubation in iodoacetamide (IA, 50mM in 50mM ammonium bicarbonate, 5µl) for another 60 minutes in the dark. Excess of IA was quenched by adding 20µl DTT (200mM in 50mM ammonium bicarbonate). Finally, samples were diluted up to a concentration of 1.5M urea, and incubated with trypsin (12.5µg/ml in 50mM ammonium bicarbonate) overnight at 37°C. After digestion, samples were dried out in a RVC2 25 speedvac concentrator (Christ, Osterode am Harz, Germany).

LC was performed using an NanoAcquity nano-HPLC (Waters, MA, USA), equipped with a Waters BEH C18 nano-column (200mm x 75µm ID, 1.8µm), a chromatographic ramp of 30 minutes (5 to 60% ACN) was used with a flow rate of 300nl/minute. Mobile phase A was water containing 0.1% v/v formic acid, while mobile phase B was CAN containing 0.1% v/v formic acid. A lock mass compound [Glu1]-Fibrinopeptide B (100fmol/µl) was delivered by an auxiliary pump of the LC system at 500nl/minute to the reference sprayer of the NanoLockSpray (Waters, MA, USA) source of the mass spectrometer. 0.5µg of each sample were loaded for each run.

MS was performed using a Synapt G2Si ESI Q-Mobility-TOF spectrometer (Waters, MA, USA) equipped with an ion mobility chamber (T-Wave-IMS) for high definition data acquisition analyses. All analyses were performed in positive mode ESI. Data were post-acquisition lock mass corrected using the double charged monoisotopic ion of [Glu1]-Fibrinopeptide B. Accurate mass LC-MS data were collected in HDDA mode that enhances signal intensities using the ion mobility separation step.

Database searching was performed using MASCOT 2.2.07 (Matrixscience, London, UK) against a UNIPROT—Swissprot database filled only with entries corresponding to *Homo sapiens* (without isoforms). For protein identification the following parameters were adopted: carbamidomethylation of cysteines as fixed modification and oxidation of methionines, and hydroxylation as variable modifications, 10ppm of peptide mass tolerance, 0.5Da fragment mass tolerance and up to 3 missed cleavage points, Peptide charges of +2 and +3.

Content of purified proteins was quantified using the Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) as previously described [41]. The protein contents in molar fraction percentages (mol%) were calculated according to the following equation:

$$\text{mol\%} = \left[\frac{\text{emPAI}}{\sum(\text{emPAI})} \right] 100$$

The identified proteins were categorized into three groups: type I collagen, other collagenous proteins and non-collagenous proteins.

Preparation of the collagen membranes

An amount of 3mg/cm² isolated type I collagen was casted into a silicone mold and air-dried at room temperature. To improve their resistance, HPCM were crosslinked according to modified existing protocols [42]. Briefly, ultraviolet light (UV) irradiation was conducted by placing HPCM in a glass dish into a BLX-E254 254nm UV irradiation lamp (VilberLourmat, Torcy, France) exposed to a UV intensity of 3.19mW/cm²/s during 100 minutes.

Optical analysis and mechanical testing

The entire tests were carried out at $20\pm 0.1^\circ\text{C}$ and before starting any measurements, the samples rested for at least 5 minutes, allowing the stresses induced during samples load to relax. This study was performed employing pre-wet (1X PBS for 24h at room temperature) 10mm diameter HPCM. All tests were carried out at least in duplicate.

Light transmission measurements were made using a narrow spectral region between 400 and 700nm using a SPELEC Spectroelectrochemical Instrument (Dropsens, Asturias, Spain) equipped with a Deuterium 215-400nm and Tungsten Halogen 360–2,500nm light source and a linear silicon CCD array with a detection range 200-900nm detector. A human cornea (74 years old) was employed as a control.

The crosslinked and non-crosslinked HPCM samples were mechanically tested with a TA. TXplus (Stable Micro Systems) texturometer with a 5mm diameter SMS P/5 S spherical probe in order to obtain the burst strength (g) and the distance at burst (mm) of the HPCM.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS software. Significant differences among defined groups were tested using the t test. A difference level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Isolation and culture of corneal endothelial cells on HPCM

Corneal endothelial cells were cultured in Optimem I (Life Technologies, CA, USA) supplemented with 8%v/v FBS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid 2-phosphate, 0.08% chondroitin sulfate, 200mg/l calcium chloride, 10U/ml penicillin and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma-Aldrich, MO, USA) and 5ng/ml epidermal growth factor (Austral Biologicals, CA, USA).

Human CECs were obtained from 26 peripheral endothelial rings from corneas previously used for PK which were maintained in Eusol-C storage medium (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Italy) at 4°C for less than 10 days before use. The mean age of corneal donors was 63 ± 2.17 years old and the endothelial cell density, determined prior to the surgery using a Cellcheck specular endothelial microscope (Konan Medical, USA), was $2,653\pm 82.51$ cells/ mm^2 . Descemet's membrane along with endothelial cells were carefully peeled off under a dissecting stereomicroscope following the Schwalbe line, and the peripheral endothelial ring was maintained overnight at 37°C in a culture plate (2cm^2), previously treated with FNC coating Mix[®] (Athena Environmental Sciences, MD, USA), with 1ml culture medium. The following day, the excess medium was removed to a volume of 150 μl and then, the peripheral endothelial ring was placed as an explant in the culture plate.

Rabbit corneal endothelial cells (rabbit CECs) were isolated from healthy New Zealand white male rabbits (2 months and 2.0–2.5kg in body weight) obtained from the Animal Housing of the University of Oviedo (Oviedo, Asturias, Spain). All animals were treated in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for use of animals in ophthalmic and vision researches. The protocols were approved (PROAE 24/2016) by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Oviedo and the Animal Production and Health Service of Asturias. Rabbits were kept under a 12/12 day/night light cycle with food and water ad libitum and were monitored on a daily basis.

Descemet's membrane along with endothelial cells were carefully peeled and digested with trypsin/EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 30 minutes at 37°C . After that, the trypsin was neutralized with culture medium. The loosened cells were centrifuged using an Eppendorf 5702R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 0.4rcf for 10 minutes and the supernatant was removed. Fresh medium was added and the cells were seeded on a culture plate previously treated with FNC coating Mix[®].

When human or rabbit cultures were confluent, cells were digested with accutase (Sigma-Aldrich, MO, USA). The loosened cells were centrifuged using an Eppendorf 5702R centrifuge at 0.4rcf for 10 minutes and the supernatant was removed. Fresh medium was added and the cells were seeded onto a HPCM using a device (11mm diameter) [43] that facilitates handling, cell culture and transport of the membranes.

All cells were cultivated under the same conditions (humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, medium changed 3 times per week).

Examination of cell cultures

Cellular growth was assessed using a Leica DMIL LED phase contrast microscope (Leica, Wetzlar, Germany); photos were taken with an attached EC3 camera (Leica, Wetzlar, Germany).

Confluent cultured HPCM were fixed using ice-cold methanol for 10 minutes for their analysis by phase contrast microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and immunocytochemistry. Methanol fixed cultured HPCM were divided in two parts, one half was rinsed with PBS solution twice for 10 minutes and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton-X100 for another 10 minutes. Next, the samples were incubated with primary antibody containing 10% normal goat serum (Abcam, Cambridge, UK) at 4°C overnight. Mouse Na⁺/K⁺ ATPase (Millipore, MA, USA) (1:100), rabbit zonula occludens-1 (ZO-1) (Life Technologies, CA, USA) (1:100) and rabbit type IV collagen (Abcam, Cambridge, UK) (1:100) single immunostains were performed in order to confirm their phenotype. Subsequently, the samples were incubated with corresponding secondary antibody (Life Technologies, CA, USA) (1:500) for 2h at room temperature. Between incubations samples were washed 3 times with PBS for 10 minutes. Immunolabeled cells were stained with DAPI to allow nuclei visualization.

The other half was cryoprotected in 30% sucrose at 4°C for 24h and frozen embedded in Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands). Next, 10µm sections were cut with a cryostat (Leica, Nussloch, Germany) and placed on commercially treated slides (Fisher-Scientific, PA, USA). Immunostaining was performed as described in the previous section using antibodies against ZO-1, Na⁺/K⁺ ATPase and type IV collagen.

All the samples were critically examined in a Leica DM6000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Surface morphology of cultured and non-cultured HPCM was examined by SEM. HPCM fixed in ice-cold methanol were rinsed in PBS, followed by dehydration through a graded series of acetone (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 10 minutes respectively and dried by the critical-point method. Afterwards, they were coated with gold under vacuum and observed with a JEOL 6610LV scanning electron microscope, (JEOL co., Tokyo, Japan) at 20kV accelerated voltage.

Transplantation of HPCM in a rabbit model

DMEK surgery was performed in six New Zealand white rabbit. Rabbits were divided into three groups: HPCM with or without cultured endothelial cells and rabbits with only peeled off Descemet's membrane.

Animals were anesthetized with buprenorphine and meloxicam, and then intubated and ventilated with isoflurane 2%. After topical administration of double anesthetic colicursi (tetracaine 0.1% and oxybuprocaine 0.4%), a 4mm wound incision was made at the limit of the corneoescleral tissue of each right eye with a slit knife, and the corneal endothelium was removed from the anterior chamber with a 30-gauge needle. HPCM with or without rabbit CECs were cut using an 8.5mm diameter trephine and stained with trypan blue solution. Grafts of HPCM, as a half-rolled taco, were placed in a disposable inserting set for Descemet lenticle with a viscoelastic agent (E.Janach, Como, Italy), injected and unfolded into the



Fig 1. DMEK surgical procedure for HPCM transplantation. (A) Descemetorrexis from the posterior stroma, (B) injected grafts of HPCM with or without RCECs and (C) unfolded HPCM inside the anterior chamber.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g001

anterior chamber and fixed to the posterior stroma stripped of Descemet's membrane (Fig 1). The sclerocorneal wound was closed with nylon sutures and a subconjunctival dose of Trigon Depot (triamcinolone acetonide 40mg/ml) was administered.

After transplantation, rabbits were treated with Tobradex (dexamethasone 1mg/ml + tobramycin 3mg/ml) and Timabak (timolol 2.5mg/ml) eye drops twice a day during all the follow-up period. The exterior appearance of rabbit eyes was monitored by taking photographs at the day of surgery, 24h after surgery, and once a week for the duration of the experiment. Six weeks after transplantation, corneal thickness was measured by anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) using a OCT CASIA SS-100 (Tomey, Erlangen, Germany). Finally, rabbits were euthanized by an intravenous overdose of pentobarbital sodium.

Corneas were excised, rinsed with PBS solution and fixed using ice-cold methanol for 4h. Corneal tissues were embedded in paraffin and then, hematoxylin-eosin (H-E) stain and immunostaining against ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase was performed as described in the previous section.

Results

Assessment of collagen content

The rate of type I collagen extraction was calculated from 10 independent isolations using different human cancellous bones. The mean soluble collagen contents were determined to be 0.23mg of collagen per mg of initial dry weight (Table 1). The mean concentration of the soluble collagens was 2.46mg/ml. For each membrane, we used about 10mg collagen that allows the preparation of at least 5 HPCM if employing the poorest collagen isolation.

Gel electrophoresis and western blot

The acid extract of human cancellous bone was subjected to SDS-8% acrylamide gel electrophoresis (Fig 2) and immunoblotting with polyclonal rabbit antibody to type I collagen (Millipore, MA, USA). The SDS-PAGE band pattern of the purified material contained at least two different α chains, but the separation of these two chains was not as pronounced as in the control group. Moreover, β chain was also found in some of the samples as well as some low molecular weight bands.

Collagen purity assessment

LC/MS analysis and posterior emPAI quantification are shown in Table 2. Type I collagen protein was present as a major product in all the purified samples ($\alpha 1 = 64.35 \pm 1.86\%$ mol;

Table 1. Assessment of collagen content (mg) and collagen concentration (mg/ml).

Samples	Dry weight (mg)	Collagen Isolation (ml)	Collagen concentration (mg/ml)	Total purified collagen (mg)
1	1,753	165	2.92	481.80
2	2,005	110	1.47	161.70
3	378	54	4.53	244.62
4	5,608	527	1.63	859.01
5	202	17	3.10	52.70
6	1,266	110	2.10	231.00
7	2,145	175	2.24	392.00
8	2,383	198	1.62	320.76
9	754	49	2.00	98.00
10	634	47.50	2.98	141.55

doi:10.1371/journal.pone.0167578.t001

$\alpha 2 = 34.09 \pm 1.79\%$ mol). Other collagenous proteins (type II, III, IV, V, XI and XII) were also found as purification subproducts. Finally, residual contaminant proteins such as actin or type I and type II keratins, were found in a $0.80 \pm 0.41\%$ mol.

Preparation of the HPCM. HPCM were obtained by evaporating the soluble collagen content of the purified extract and crosslinking by UV light exposure. Fabricated membranes had an average area of 3.46cm^2 and thickness of $20\mu\text{m}$ showing a randomly oriented fibrillar structure when the surface was observed under SEM (Fig 3).

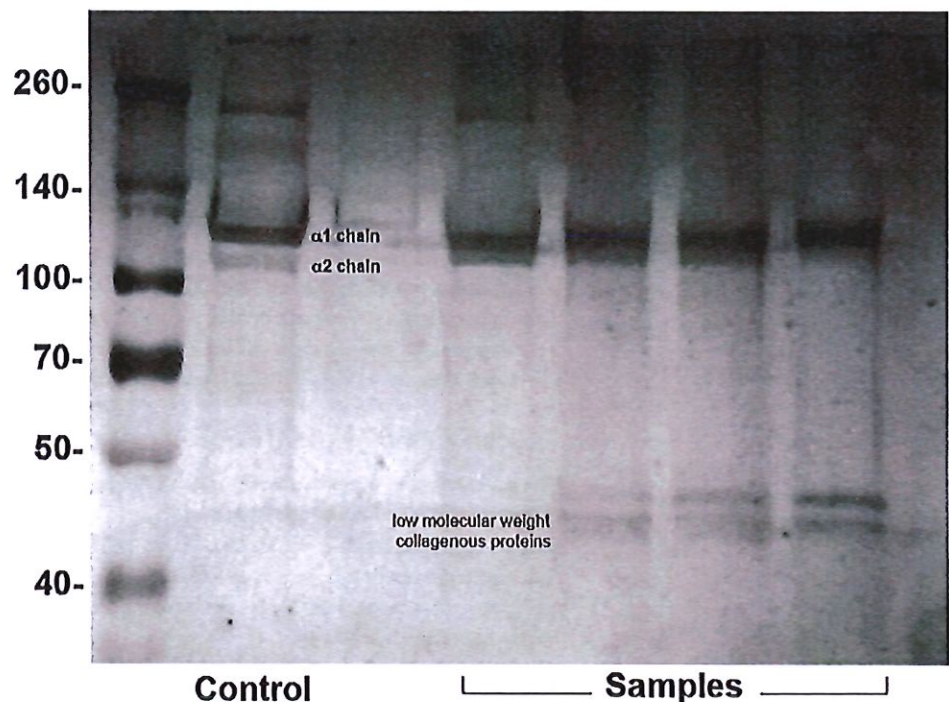


Fig 2. Analysis by SDS-PAGE and Immunoblotting of type I collagen preparation from human cancellous bone. Control group: lane 1; Samples: lanes 2, 3, 4 and 5.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g002

Table 2. %mol of proteins determined by LC/MS.

Samples	Type I collagen		Other collagenous proteins						Non-collagenous proteins
	α1	α2	Type II	Type III	Type IV	Type V	Type XI	Type XII	
1	64.18	35.44	0.09 (α1)	0.09 (α1)	0.04 (α5)	-	-	-	0.15
2	69.3	28.64	0.32 (α1)	0.61 (α1)	-	0.06 (α1)	0.03 (α1) 0.03 (α2)	-	0.95
3	58.73	37.21	0.39 (α1)	0.83 (α1)	-	-	-	0.06 (α1)	2.78
4	68.18	30.56	0.19 (α1)	0.45 (α1)	0.03 (α5)	0.08 (α1) 0.08 (α2)	0.03 (α1) 0.03 (α2)	-	0.39
5	66.62	32.35	0.08 (α1)	0.38 (α1)	0.04 (α5)	0.08 (α1)	0.04 (α1)	-	0.36
6	59.10	40.32	0.14 (α1)	0.07 (α1)	0.01 (α5)	0.06 (α1) 0.05 (α2)	0.01 (α1) 0.01 (α2)	-	0.19

doi:10.1371/journal.pone.0167578.t002

Optical analysis and mechanical testing

As shown in Fig 4, HPCM was optically transparent at all wavelengths of the visible light electromagnetic spectrum with a mean value of light transmission of $78.10 \pm 1.77\%$ and $77.89 \pm 1.43\%$ in crosslinked and non-crosslinked HPCM respectively, showing no significant differences at any point of the visible light electromagnetic spectrum. When these values were compared with the light transmission of a control human cornea (67.84 ± 2.51), crosslinked and non-crosslinked HPCM displayed statistically significantly higher values ($p < 0.01$).

Mechanical testing revealed an enhancement in both: the resistance, determined by the burst strength, and the elasticity, determined by the distance at burst in the crosslinked HPCM. This difference ($p < 0.01$) was statistically significant compared to the non-crosslinked HPCM (Table 3).

Isolation, culture and examination of corneal endothelial cells on HPCM

Human CECs were observed to have migrated from the explant onto the plate after 3–4 days in culture, and by day 30 a monolayer of compact cells had formed on the plate, immediately adjacent to the explant in 13 of the 26 peripheral endothelial rings processed. These cells displayed their typical hexagonal endothelial morphology, while in the other 13 cultures, cells showed signs of endothelial-mesenchymal transition resulting in the loss of corneal endothelial specific hexagonal morphology and transformation into an elongated and fibroblast like abnormal phenotype (Fig 5). No significant differences were found between different endothelial cultures when comparing cell density, determined prior to the surgery, or age of the corneal donors (Table 4). After 30 days, confluent hexagonal endothelial cells were detached and subcultured on HPCM. In the same way, rabbit CECs were able to attach and proliferate when isolated, by trypsin/EDTA digestion, and subcultured on HPCM.



Fig 3. (A) Macro photograph appearance of HPCM, (B) SEM microphotograph displaying fibrillary ultrastructure and (C) thickness of HPCM.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g003

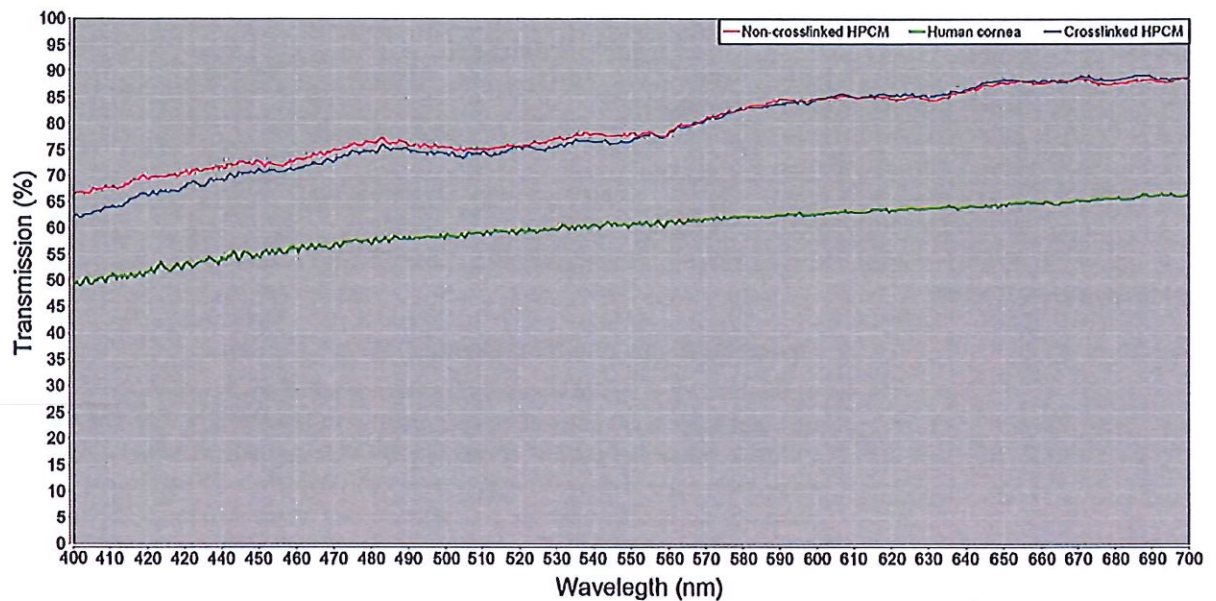


Fig 4. Optical properties (% light transmission) of crosslinked, non-crosslinked HPCM and human control cornea.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g004

Under phase contrast microscope and SEM, human CECs and rabbit CECs demonstrated their ability to attach and proliferate when cultured on HPCM, maintaining their polygonal morphology (Fig 6).

Immunohistochemical analysis revealed a positive stain for ZO-1, a tight junction associated protein responsible for establishing the passive permeability properties of the endothelial barrier and Na⁺/K⁺ ATPase, an integral membrane protein responsible for regulating pump functions. Additionally, it also showed a positive stain for a newly formed basal membrane protein, type IV collagen (Figs 7 and 8).

Transplantation of HPCM

Corneal edema and white turbidity appeared few days after surgery in the three groups, rabbits transplanted with or without rabbit CECs cultured on HPCM and rabbits with only Descemet's membrane peeled (Fig 9). Transplanted corneas with cultured rabbit CECs on HPCM began to become transparent by day 10 and corneal transparency was maintained up to 6 weeks. However, the eyes in the group without rabbit CECs on HPCM and rabbits with peeled off Descemet's membrane did not restore corneal transparency and retained a corneal edema during the follow up period. No obvious signs of immune rejection were found in any group.

Results of AS-OCT revealed HPCM with cultured endothelial cells as a fully integrated component in the corneal tissue, displaying a similar corneal thickness when compared to its healthy contralateral cornea. On the other hand, HPCM without corneal endothelial cells and

Table 3. Mechanical properties of HPCM calculated using TA.TXplus texturometer (values are shown as mean±SEM).

	Crosslinked membranes	Non-crosslinked membranes
Burst strength (g)	178.12±19.46	19.78±7.24
Distance at burst (mm)	2.53±0.27	0.78±0.33

doi:10.1371/journal.pone.0167578.t003

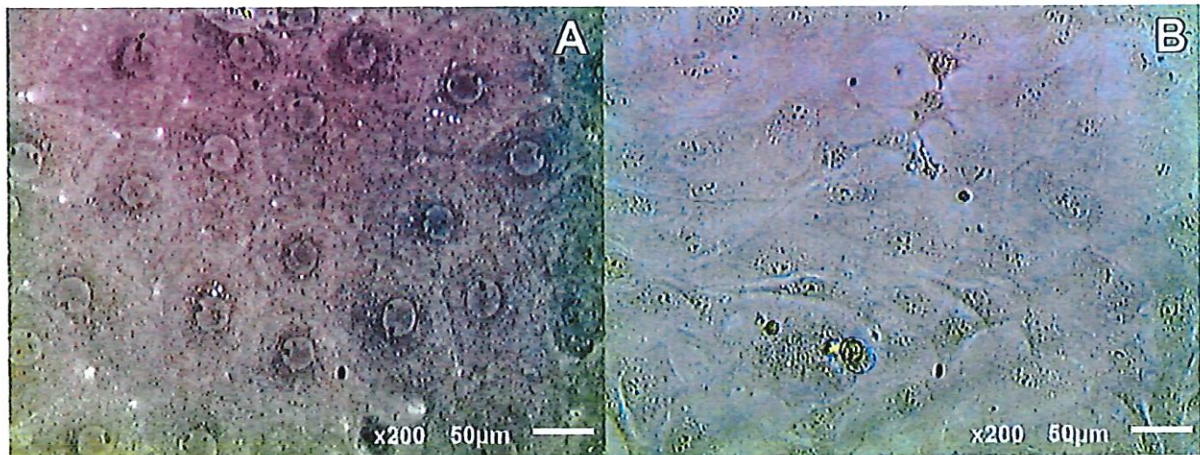


Fig 5. Microphotographs of human CEC displaying hexagonal and endothelial-mesenchymal transformed morphology.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g005

rabbits with peeled off Descemet’s membrane only revealed an enhancement in corneal thickness reflecting a loss of corneal endothelial functionality (Fig 10).

The histological analysis showed a slightly marked fibrotic tissue in the posterior segment of the stroma in rabbits transplanted without corneal endothelial cells on HPCM and an apparent corneal edema and fibrotic tissue in the rabbits with peeled off Descemet’s membrane. HPCM, in rabbits transplanted with cultured cells, was attached tightly to the corneal stroma and rabbit CECs formed a continuous monolayer with the same morphology and phenotypical markers, ZO-1 and Na⁺/K⁺ ATPase, as a healthy control eye (Fig 11). No sign of endothelia remains were found in any of the transplanted corneas.

Hematoxylin-eosin stain (top row), ZO-1 (middle row) and Na⁺/K⁺ ATPase (bottom row) immunofluorescence of: control healthy cornea (first column), transplanted HPCM with (second column) or without (third column) rabbit CECs and cornea with only peeled off Descemet’s membrane (fourth column) at 6 weeks. Nuclei stained in blue.

Discussion

Human corneal endothelial cellular loss or damage leads to stromal edema, loss of transparency, and will eventually lead to blindness, requiring a healthy endothelial layer to reverse the edema [44]. Nowadays the lack of corneal tissue is one of the hardest hurdles to overcome for corneal repair. This barrier is even more pronounced in countries with a poor donation system or in those whose ethics or religious convictions forbid tissue and organ donations.

Cell therapies and tissue engineering may be the future tools that allows these limitations to be surpassed through the optimization of protocols for the *in vitro* expansion of human CECs and the development of tissue-engineered scaffolds.

Table 4. Human CEC cultures displaying typical hexagonal cell morphology or endothelial-mesenchymal transformation grouped by endothelial cell density, determined prior to surgery, and age of the corneal donors (values are shown as mean±SEM).

	Age (years)	Cellular density (cell/mm ²)
Typical hexagonal cell morphology	64.33±2.69	2,546±121.8
Endothelial-mesenchymal transformation	61.91±3.57	2,760±107

doi:10.1371/journal.pone.0167578.t004

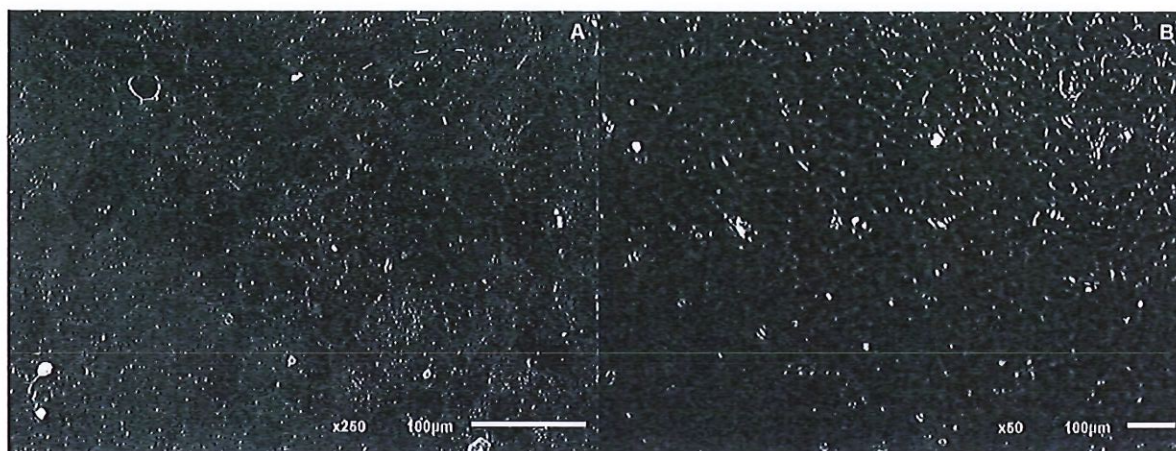


Fig 6. (A) SEM and (B) phase contrast microscopy micrographs of human CECs growing on HPCM.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g006

In recent years, the culture technics of human CECs have been extensively improved allowing their isolation and expansion in culture [45,46]. A large number of studies have demonstrated the possibility of transplanting them in animal models with [25] or without [47] a carrier. Intracameral injection of CECs for corneal endothelial dysfunctions has appeared as a promising therapy, even more so if it is associated with the use of ROCK kinase inhibitor to enhance the attachment of injected CECs [3,48]. However, these new approaches will have to overcome the problems associated with injection of CECs, such as systemic dispersion of CECs. At the moment, the use of a scaffold that allows the growth of CECs appears as a better

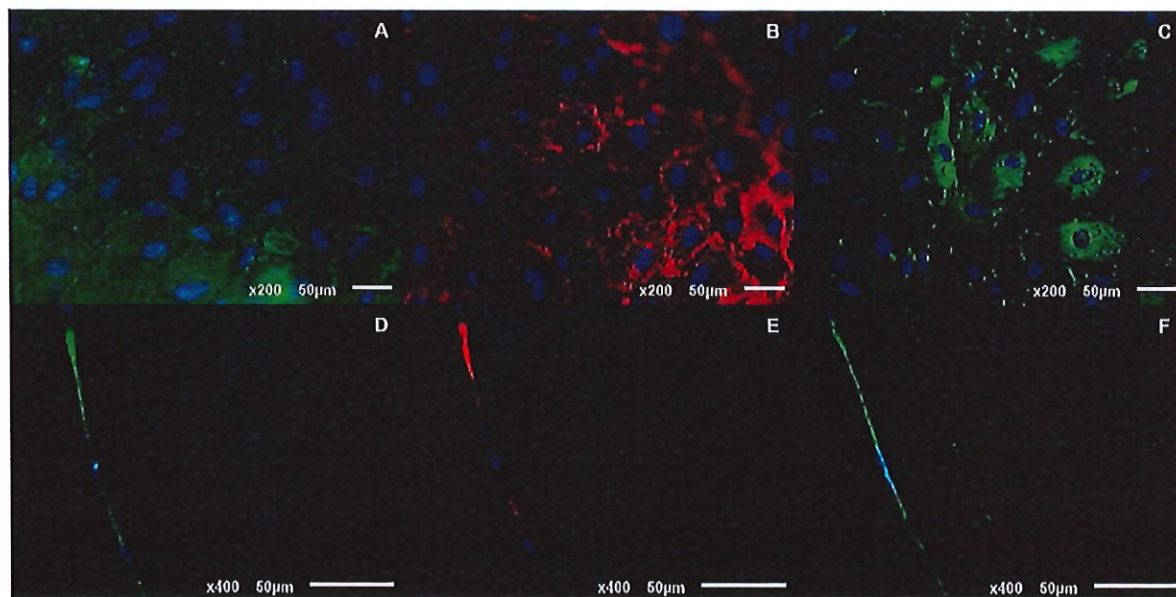


Fig 7. (A, B&C) Whole-mount and (D, E&F) frozen section immunostains of human CEC cultured on HPCM. ZO-1 (A&D), Na⁺/K⁺ ATPase (B&E) and type IV collagen (C&F). Nuclei stained in blue.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g007

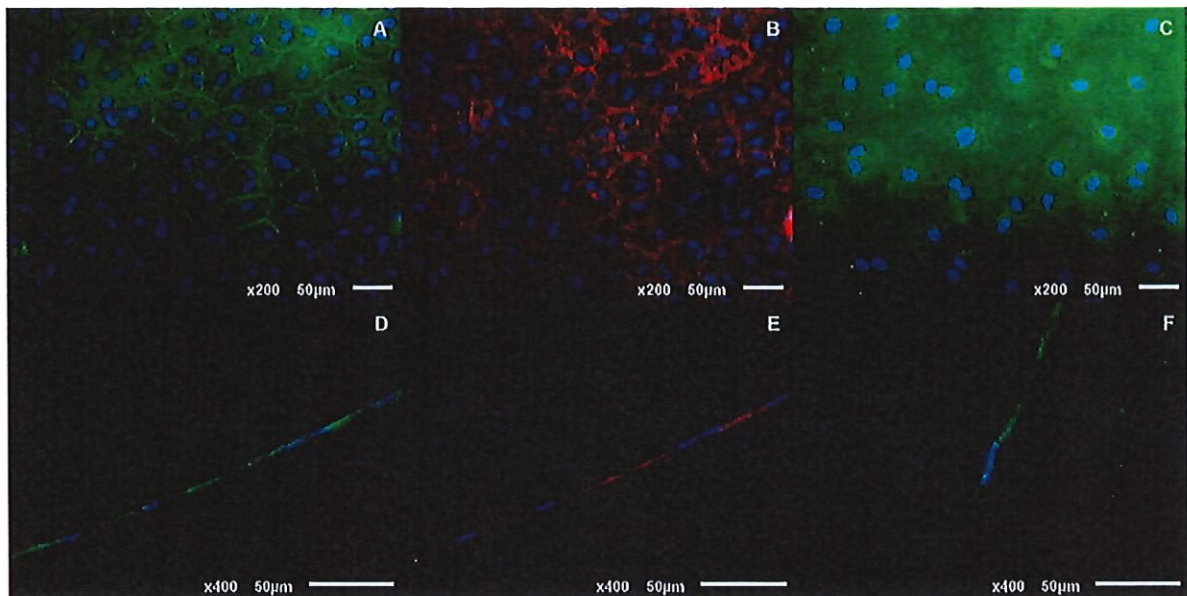


Fig 8. (A, B&C) Whole-mount and (D, E&F) frozen section immunostains of rabbit CEC cultured on HPCM. ZO-1 (A&D), Na⁺/K⁺ ATPase (B&E) and type IV collagen (C&F). Nuclei stained in blue.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g008

way to control the corneal attachment of CECs. However, future studies will need to elucidate the most effective treatment for corneal endothelial dysfunctions.

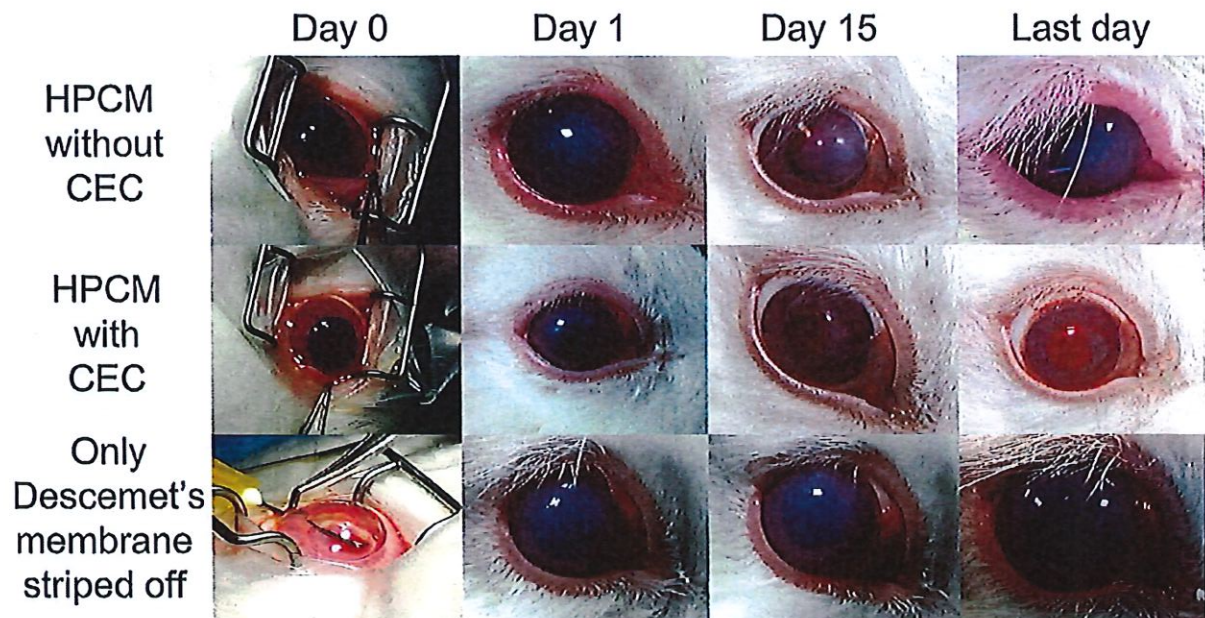


Fig 9. Macrophotographs of the exterior appearance of transplanted rabbit eyes during the 6 week follow-up period.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g009

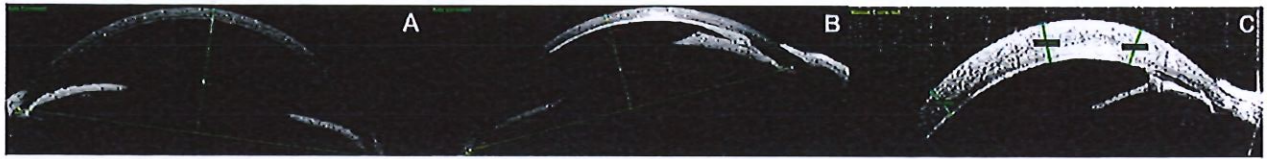


Fig 10. AS-OCT of transplanted rabbit corneas displaying corneal thickness at 6 weeks.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g010

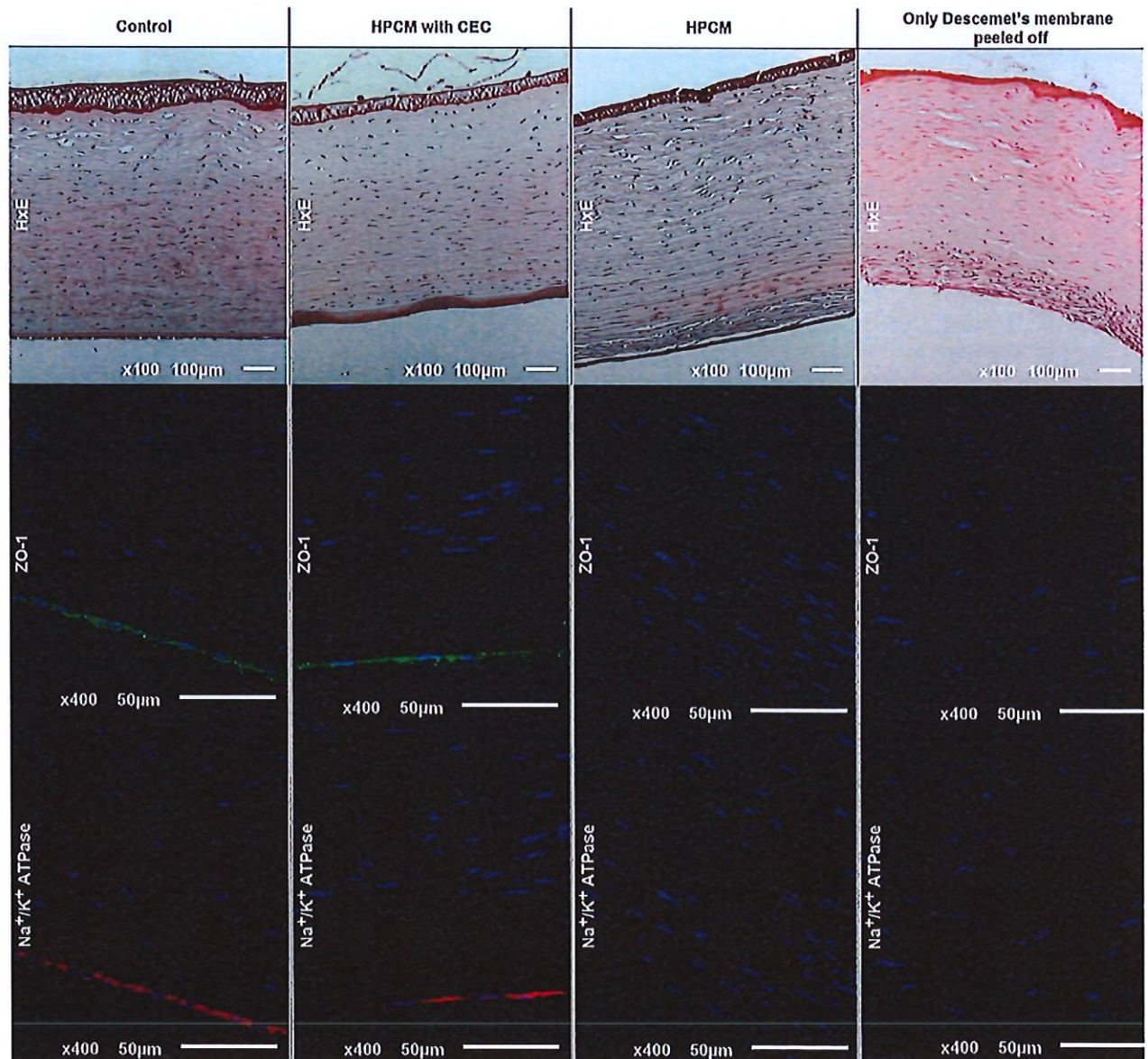


Fig 11. Histological analysis of transplanted rabbit corneas.

doi:10.1371/journal.pone.0167578.g011

Different scaffolds have already been used as artificial Descemet's membrane for the growth of human CECs. Several groups have used bovine or porcine type I collagen as scaffold for these purposes, showing in different animal models that corneal endothelial dysfunctions can be treated [25,30].

However, the clinical application of tissue engineered therapies should avoid the use of xenogeneic products as far as possible. For this purpose, we have developed an artificial endothelial graft using type I collagen isolated from remnant human cancellous bone.

The analysis of emPAI based molar fractions of our samples demonstrate that type I collagen can be isolated in a relatively easy, short and reproducible process (with a low presence of different bone associated collagens and residual contaminants) from cancellous bones routinely processed in tissue banks. In our local tissue bank 8,000cc of cancellous bone are processed every year and, in many donors, small tissue remnants (4-10cc) are left unused. These cancellous bone remnants could potentially be used for type I collagen isolation.

Moreover, this product is safe because the donors are selected based on their clinical history and serological tests (HIV; HVB; HCV and syphilis) and its origin is traceable because tissue banks stores the donor's data.

In the present study, and using the isolated collagen, we developed a HPCM with a thickness similar to Descemet's membrane. These HPCM needed to be crosslinked by UV light to increase their mechanical properties (resistance and elasticity), however, light transmission values weren't affected and HPCM still showed better optical qualities than a normal human cornea.

On the other hand, we cultured human CECs from peripheral endothelium of corneas previously used as grafts for PK; peripheral ring cells have more regenerative capacity [49] and are a source of cells that are not used in transplant procedures. Per peripheral ring and with the culture method here described, we are able to obtain a HPCM of 11mm in diameter cultured with polygonal human CECs in one out of two corneas processed. This was not related to the age nor the endothelial cellular density of corneal donors, suggesting, as previously described [50], a direct relationship between the relative health of the donors before death as well as the period between death, tissue processing and cellular culture in the ability of these cells to grow and its outcome in culture. HPCM have proven to be a good substrate for human CECs since cells growing on HPCM expressed characteristic markers, such as ZO-1 and Na^+/K^+ ATPase. Moreover, they also expressed type IV collagen, a protein present in the Descemet's membrane, displaying the same expression pattern as that found in a healthy corneal endothelium.

To evaluate *in vivo* application of our artificial endothelial grafts, we performed a DMEK surgery in a rabbit model. After surgery, no signs of immunological rejection were found, and the HPCM with cultured rabbit CECs were able to restore corneal transparency in the transplanted corneas, appearing as a fully integrated lamellar graft in H-E stain with a normal corneal thickness as shown by AS-OCT. Moreover, not finding any sign of endothelium remains indicates that a complete descemetorrexsis was performed. This implies that the restoration of corneal transparency did not originate from autologous cell proliferation. Additionally, immunofluorescence results indicate that rabbit CECs formed a continuous monolayer with the same phenotypical markers that in a control cornea.

Nevertheless, our current work scheme still has some issues to resolve. We are currently using a commercially available porcine derived pepsin in the extraction process, because this protease produces a better yield of collagen extraction. Moreover, we use FBS for the culture of human CECs. In future works, it is desirable that xenogeneic products were replaced by human derived products.

In conclusion, our work shows that it is possible to generate new artificial lamellar endothelial grafts using human type I collagen and endothelial cells from remnant tissues from tissue

banks and that these artificial lamellar endothelial grafts can be transplanted in a rabbit model with satisfactory results. With this new approach it could be possible to increase the total number of patients grafted by generating new artificial endothelial lamellar grafts.

Acknowledgments

Authors wish to thank Paz Cañal and Rosana Martínez from Centro Comunitario de Sangre y Tejidos and all the diagnostic team from the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega for their skillful technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: NV JML AM.

Data curation: NV MC.

Formal analysis: NV MC.

Funding acquisition: JML AM.

Investigation: NV MC CARB IZA.

Methodology: NV MC CARB AM.

Project administration: NV JML AM.

Resources: BB MN JFA ACR.

Software: MC.

Supervision: JML AM.

Validation: NV MC AM.

Visualization: NV MC AM.

Writing – original draft: NV MC AM.

Writing – review & editing: NV MC AM.

References

1. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134: 167–173. doi: [10.1001/jamaophthalmol.2015.4776](https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776) PMID: [26633035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633035/)
2. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, et al. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95: 1006–9. doi: [10.1136/bjo.2010.194571](https://doi.org/10.1136/bjo.2010.194571) PMID: [21398412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21398412/)
3. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol.* 2012; 181: 268–77. doi: [10.1016/j.ajpath.2012.03.033](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.033) PMID: [22704232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22704232/)
4. Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea.* 1998; 17: 618–26. PMID: [9820943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9820943/)
5. Melles GRJ, Wijdh RHJ, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea.* 2004; 23: 286–8. PMID: [15084862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15084862/)
6. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea.* 2006; 25: 886–9. doi: [10.1097/01.ico.0000214224.90743.01](https://doi.org/10.1097/01.ico.0000214224.90743.01) PMID: [17102661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17102661/)
7. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Slomovic A, Rootman D. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 2008; 115: 1525–33. doi: [10.1016/j.ophtha.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.02.010) PMID: [18440638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440638/)

8. Satué M, Rodríguez-Calvo-de-Mora M, Naveiras M, Cabrerizo J, Dapena I, Melles GRJ. Standardization of the Descemet membrane endothelial keratoplasty technique: Outcomes of the first 450 consecutive cases. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2015; 90: 356–64. doi: [10.1016/j.oftal.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.oftal.2015.01.004) PMID: [25817960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25817960/)
9. Joyce NC, Mehlir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 645–655.
10. Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 1566–1575. PMID: [8675399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8675399/)
11. Murphy C, Alvarado J, Juster F, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1984; 25: 312–322.
12. Bigar FWR. Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology*. 1982; Jun; 89(6): 596–9. PMID: [7122040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7122040/)
13. Morikubo S, Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Corneal changes after small-incision cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122: 966–969. doi: [10.1001/archoph.122.7.966](https://doi.org/10.1001/archoph.122.7.966) PMID: [15249359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15249359/)
14. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2012; 95: 16–23. doi: [10.1016/j.exer.2011.08.014](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.08.014) PMID: [21906590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21906590/)
15. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea*. 2001; 20: 731–737. PMID: [11588426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588426/)
16. Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg*. 1993; 19: 232–5. PMID: [8487165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8487165/)
17. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 800–806. PMID: [14985293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14985293/)
18. Jumball MM, Maurice DM, Schwartz BD. A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation*. 1980; 29: 498–9. PMID: [7404655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7404655/)
19. McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD. Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology*. 1980; 87: 194–201. PMID: [6999416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6999416/)
20. Schwartz BD, McCulley JP. Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981; 20: 467–80. PMID: [7012085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7012085/)
21. Lai J-Y, Chen K-H, Hsueh G-H. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation*. 2007; 84: 1222–32. doi: [10.1097/01.tp.0000287336.09848.39](https://doi.org/10.1097/01.tp.0000287336.09848.39) PMID: [18049106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18049106/)
22. Yoeruek E, Saygılı O, Spitzer MS, Tatar O, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2009; 28: 416–20. doi: [10.1097/ICO.0b013e31818c2c36](https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31818c2c36) PMID: [19411960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19411960/)
23. Madden PW, Lai JN, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials*. 2011/03/24. 2011; 32: 4076–4084. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.12.034](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.034) PMID: [21427010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21427010/)
24. Ozcelik B, Brown KD, Blencowe A, Daniell M, Stevens GW, Qiao GG. Ultrathin chitosan-poly(ethylene glycol) hydrogel films for corneal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013; 9: 6594–6605. doi: [10.1016/j.actbio.2013.01.020](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.020) PMID: [23376126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376126/)
25. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 2992–2997. doi: [10.1167/iov.03-1174](https://doi.org/10.1167/iov.03-1174) PMID: [15326112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15326112/)
26. Zhang J, Sisley AMG, Anderson AJ, Taberner AJ, McGhee CNJ, Patel DV. Characterization of a Novel Collagen Scaffold for Corneal Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 22: 1–28.
27. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000; 6: 307–319. doi: [10.1089/107632700418038](https://doi.org/10.1089/107632700418038) PMID: [10992428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10992428/)
28. Islam MM, Cepla V, He C, Edin J, Rakickas T, Kobuch K, et al. Functional fabrication of recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels for regenerative medicine applications. *Acta Biomater*. 2015; 12: 70–80. doi: [10.1016/j.actbio.2014.10.035](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.035) PMID: [25448347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25448347/)
29. Yoshida J, Oshikata-Miyazaki A, Yokoo S, Yamagami S, Takezawa T, Amano S. Development and evaluation of porcine atelocollagen vitrigel membrane with a spherical curve and transplantable artificial corneal endothelial grafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 4975–81. doi: [10.1167/iov.14-14211](https://doi.org/10.1167/iov.14-14211) PMID: [25028359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25028359/)

30. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 4519–26. doi: [10.1167/iovs.07-0567](https://doi.org/10.1167/iovs.07-0567) PMID: [17898273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17898273/)
31. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ, et al. Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea.* 2008; 27 Suppl 1: S48–55.
32. Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chem.* 2008; 108: 49–54.
33. Polaros T, Raksakulthai N, Runglerdkreangkrai J. Characteristics of Collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Isolated by Two Different Methods. *Nat Sci.* 2009; 43: 584–593.
34. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012. pp. 1063–1077. doi: [10.1016/j.addr.2012.06.008](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.008) PMID: [22728914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22728914/)
35. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014; 25: 2445–2461. doi: [10.1007/s10856-014-5240-2](https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2) PMID: [24865980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24865980/)
36. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater.* 2013; 9: 7865–7873. doi: [10.1016/j.actbio.2013.04.029](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.029) PMID: [23624219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23624219/)
37. Pietrzak WS, Ali SN, Chitturi D, Jacob M, Woodell-May JE. BMP depletion occurs during prolonged acid demineralization of bone: Characterization and implications for graft preparation. *Cell Tissue Bank.* 2011; 12: 81–88. doi: [10.1007/s10561-009-9168-6](https://doi.org/10.1007/s10561-009-9168-6) PMID: [20039143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20039143/)
38. Hong Y, Huber A, Takanari K, Amoroso NJ, Hashizume R, Badylak SF, et al. Mechanical properties and in vivo behavior of a biodegradable synthetic polymer microfiber-extracellular matrix hydrogel bio-hybrid scaffold. *Biomaterials.* 2011; 32: 3387–3394. doi: [10.1016/j.biomaterials.2011.01.025](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.025) PMID: [21303718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303718/)
39. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 93: 440–447. PMID: [13786180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13786180/)
40. Laemmli UK. Piezoelectric effect and growth control in bone. *Group.* 1970; 227: 680–685.
41. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4: 1265–1272. doi: [10.1074/mcp.M500061-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200) PMID: [15958392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15958392/)
42. Lee JE, Park JC, Hwang YS, Kim JK, Kim JG, Sub H. Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes: morphology, enzymatic degradation, and mechanical properties. *Yonsei Medical Journal.* 2001. pp. 172–179. doi: [10.3349/ymj.2001.42.2.172](https://doi.org/10.3349/ymj.2001.42.2.172) PMID: [11371103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11371103/)
43. Vázquez N, Chacón M, Meana Á, Menéndez-Menéndez Y, Ferrero-Gutiérrez A, Cerejillo-Martín D, et al. Keratin-chitosan membranes as scaffold for tissue engineering of human cornea. *Histol Histopathol.* 2015; 30: 813–821. doi: [10.14670/HH-11-585](https://doi.org/10.14670/HH-11-585) PMID: [25587895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587895/)
44. Tan DTH, Dart JKG, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Curr Opin Ophthalmol.* 1992; 3: 473–481.
45. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 660–7. PMID: [10711678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10711678/)
46. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 1626–1631. doi: [10.1167/iovs.04-1263](https://doi.org/10.1167/iovs.04-1263) PMID: [15851561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851561/)
47. Mimura T, Shimomura N, Usui T, Noda Y, Kaji Y, Yamagami S, et al. Magnetic attraction of iron-encapsulated corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Exp Eye Res.* 2003; 76: 745–51. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742357> PMID: [12742357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12742357/)
48. Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, Kitano J, Nakano S, Tsujimoto Y, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Nat Publ Gr.* 2016;
49. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998; 34: 149–153. doi: [10.1007/s11626-998-0097-7](https://doi.org/10.1007/s11626-998-0097-7) PMID: [9542652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9542652/)
50. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1743–1751. PMID: [15161835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15161835/)

Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration

J Zavala¹, GR López Jaime²,
CA Rodríguez Barrientos¹ and J Valdez-García^{1,3}

Abstract

The main treatment available for restoration of the corneal endothelium is keratoplasty. This procedure is faced with several difficulties, including the shortage of donor tissue, post-surgical complications associated with the use of drugs to prevent immune rejection, and a significant increase in the occurrence of glaucoma. Recently, surgical procedures such as Descemet's stripping endothelial keratoplasty have focused on the transplant of corneal endothelium, yielding better visual results but still facing the need for donor tissue. The emergent strategies in the field of cell biology and tissue cultivation of corneal endothelial cells aim at the production of transplantable endothelial cell sheets. Cell therapy focuses on the culture of corneal endothelial cells retrieved from the donor, in the donor's cornea, followed by transplantation into the recipient. Recently, research has focused on overcoming the challenge of harvesting human corneal endothelial cells and the generation of new biomembranes to be used as cell scaffolds in surgical procedures. The use of corneal endothelial precursors from the peripheral cornea has also demonstrated to be effective and represents a valuable tool for reducing the risk of rejection in allogeneic transplants. Several animal model reports also support the use of adult stem cells as therapy for corneal diseases. Current results represent important progresses in the development of new strategies based on alternative sources of tissue for the treatment of corneal endotheliopathies. Different databases were used to search literature: PubMed, Google Books, MD Consult, Google Scholar, Gene Cards, and NCBI Books. The main search terms used were: 'cornea AND embryology AND transcription factors', 'human endothelial keratoplasty AND risk factors', '(cornea OR corneal) AND (endothelium OR endothelial) AND cell

culture', 'mesenchymal stem cells AND cell therapy', 'mesenchymal stem cells AND cornea', and 'stem cells AND (cornea OR corneal) AND (endothelial OR endothelium)'. *Eye* (2013) 27, 579–588; doi:10.1038/eye.2013.15; published online 8 March 2013

Keywords: corneal endothelium; tissue engineer; stems cells

Introduction

The cornea is a transparent avascular tissue that in conjunction with the sclera forms the outer portion of the eye. It is a connective tissue that acts as the primary barrier against infection and mechanical damage to the internal structures of the eye. Along with the tear film on the ocular surface, it accounts for more than two-thirds of the total refractive power of the eye. It is organized into three cell layers: epithelium, stroma, and endothelium, and two interfaces: Bowman's layer and Descemet's membrane.¹ The epithelium provides a biodefense system on the anterior surface of the eye, helps to keep the corneal surface optically smooth, and provides a barrier to external biological agents and chemical damage. Bowman's layer serves as an interface between the epithelium and the stroma and consists of randomly arranged collagen fibers and proteoglycan types I and III. The stroma constitutes about 90% of the thickness of the cornea and is composed of extracellular matrix, keratinocytes, and nerve fibers. It provides structural strength, shape, stability, and transparency to the cornea. The endothelium is a thin monolayer of polygonal cells covering the posterior surface of Descemet's membrane and is in contact with the

¹Ophthalmology Research Chair, Tecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences, Monterrey, México

²Medical and Surgical Retina Residency Program Department, Universidad de Guadalajara Instituto de Oftalmología y Ciencias Visuales, Guadalajara, México

³Instituto de Oftalmología y Ciencias Visuales - Tec Salud, Monterrey, México

Correspondence: J Valdez-García, Tecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences, 3000 Morones Prieto Avenue Col. Los Doctores Monterrey, Monterrey 64710 México. Tel/Fax: +518188882066; E-mail: jorge.valdez@itesm.mx

Received: 12 September 2012
Accepted in revised form: 25 January 2013
Published online: 8 March 2013

aqueous humor (Figure 1). The main function is to regulate the hydration state through an active ATP and bicarbonate-dependent pump; thereby providing transparency to the cornea, which allows the eye to

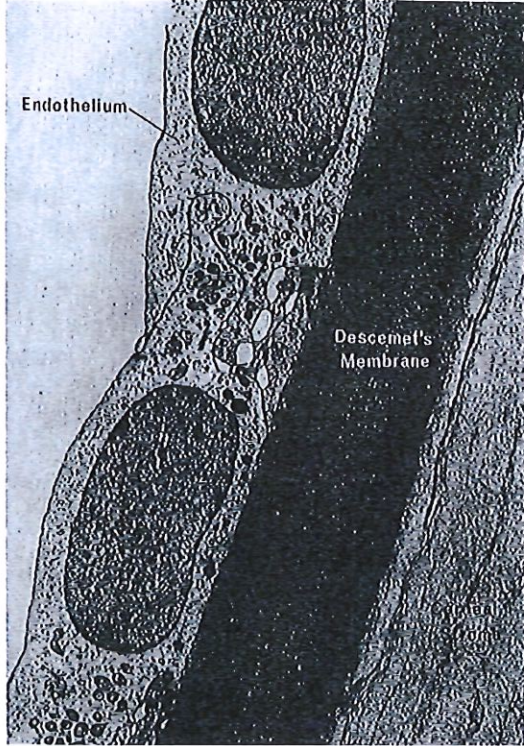


Figure 1 Electron micrograph of corneal endothelium underlying Descemet's membrane of the human cornea (with permission of Cell Image Library CL: 10944* <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode>).

perform its visual functions.² It is also an important system for the passage of nutrients and waste removal through simple diffusion, facilitated diffusion, and active transport mechanisms.³

The corneal endothelium is the cell layer with the lowest mitotic activity.⁴ Given the importance of its function, damage to the endothelium is potentially more serious than that to the other corneal layers and can result in cell loss and irreversible damage to the endothelial cytoskeleton, that ultimately affecting visual function.⁵ The main treatment for this condition is corneal transplant. Nevertheless, given the difficulty obtaining donor tissue, the development of novel strategies has focused on the use of cultured corneal endothelial cells, corneal endothelial stem cells, and stem cells of extra-ocular origin. In this article, we describe the corneal endothelium's embryology and physiology, the main conditions that affects it and the cell therapies currently under development.

Embryology

The embryological origins of the major structures of the eye are diverse. The central part of the cornea, including the endothelium, is derived from neural crest cells. The retina and the epithelial layers of the iris and ciliary body are derived from the anterior neural plate, the lens from surface ectoderm, and the corneal epithelium from epidermal ectoderm.^{6,7}

The cornea is formed as a result of the last series of major inductive events during eye development at ~5–6 weeks of human gestation, when the surface ectoderm interacts with the lens vesicle (Figure 2). When they are completely apart, the space between them is filled with perinuclear mesenchyme cells, from the neural crest. The mesenchyme then condenses and forms several layers

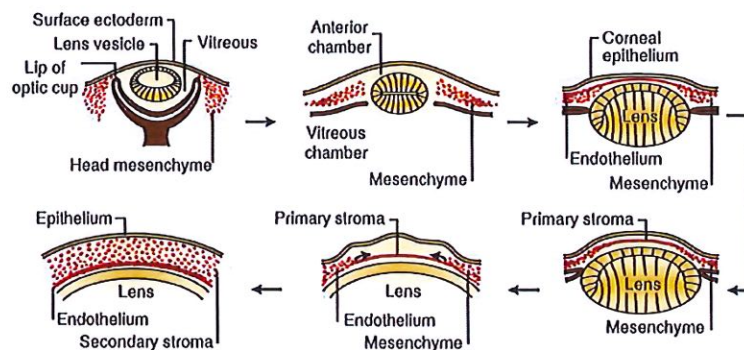


Figure 2 Formation of the cornea. The cornea begins to develop when the surface ectoderm closes after the formation of the lens vesicle and its detachment from the surface ectoderm. Mesenchymal cells (neural crest cells) invade the cornea and form the corneal stroma after condensation (with permission of Nature Publishing Group). Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Academic Press.⁷

separated by extracellular matrix. The cells closer to the lens become the corneal endothelium and the surface ectoderm on the anterior surface, becomes the corneal epithelium.^{6,7} Around the 78 mm stage, the endothelial cells become flattened and tightly connected to one another by tight junctions. Immediately anterior to this layer there is a homogeneous acellular layer, which becomes Descemet's membrane. By the 120 and 165 mm stages of development, the endothelial monolayer is of uniform thickness spans the entire posterior corneal surface and fuses with the cells of the trabecular meshwork. The endothelial cells stay arrested in the G1-phase of mitosis.⁸

The mechanisms of neural crest cell migration are not fully understood. It is the coordinated action of transcription factors and inductive signals that mediate the proper development of the periorcular mesenchyme. Some of the transcription factors involved in these events are: Foxc1, Foxc2, Lmx1b, Pax6, Pitx2, RAR β , RAR γ , RXR α , Six3, and Smad2.⁹⁻¹²

Pax6 is a known master gene involved in ocular development. It is required for the development of all layers of the cornea.¹⁰ In mice, it is regulated by Six3 and Lmx1b, and together with Sox2, acts on the surface ectoderm to regulate the expression of crystalline genes.^{13,14} Molecules like FGF2, TGF β 1, TGF β 2, and Bmp7 are also involved in regulating expression of Pax6. FGF2 participates in the process of invagination of the optic vesicle; together with Bmp7, it regulates the optimal level of Pax6 expression.^{13,15} Bmp7 indirectly controls the Sox2 signal in the lens ectoderm, which either upregulates or downregulates Pax6 expression.¹⁶ TGF β 1 and TGF β 2 have been shown to increase the expression of Foxc1 and Pitx2,^{17,18} which are required for the development of the ocular anterior segment.¹⁹⁻²¹ It has been proposed that the TGF- β subfamily members initiate a supporting mechanism to regulate Pax6 function and transcription.²² In the corneal endothelium, TGF β 1 and TGF β 2 modulate cell proliferation, cell morphology, and collagen expression.^{23,24}

In the mouse head mesenchyme, retinoic acid receptor heterodimers RXR α /RAR β and RXR α /RAR γ regulate the expression of Foxc1 and Pitx2, and control the extent of cell death during remodeling of periorcular mesenchyme.²⁵ Together, Pax6, Lmx1b, and Pitx2 have a key role in the maintenance of corneal endothelium integrity.¹³

Although there has been significant progress in the understanding of human eye development during embryogenesis, further research is needed to clarify the mechanisms by which expression of these (and other) transcription factors lead to the proper development of corneal endothelium and other structures of the eye's anterior segment.

Corneal endothelium physiology

The corneal endothelium consists of a 4- μ m thick monolayer of polygonal, mostly hexagonal cells. In the adult, the average cell density is \sim 3000 cells/mm² and the percentage of hexagonal cells is about 75%.^{26,27} The density of corneal endothelial cells and their surface changes throughout life are noted in Figure 3. From the second to the eighth decade, the cell density declines to about 2600 cells/mm² and the percentage of hexagonal cells decreases to \sim 60%. The central endothelial cell density decreases at an average rate of 0.6% per year.^{28,29} To preserve ocular transparency, endothelial cell density must remain above a critical level, usually between 400 and 500 cells/mm².³⁰ Adjacent cells communicate through gap junctions and tight junctions, whereas the basal surface is adhered to Descemet's membrane by hemidesmosomes.^{31,32} Tight junctions (ZO-1) are supramolecular assemblies, that form intercellular junctions, and are found close to the apical domains of the endothelial cells. This allows the endothelium to function as a barrier, forming resistance to the permeability of solutes and fluid through paracellular transport routes.^{30,33}

There are integral proteins in the cellular membrane, the aquaporins (AQP), which with the Na⁺/K⁺ ATPase pump participate in the fluid movement across the endothelium and function as water selective channels. The isoform AQP-1 is expressed by the corneal endothelial cells and the lens epithelium.^{34,35}

Corneal endothelial cells secrete collagen type VIII,³⁶ an important component of Descemet's membrane that is actively produced during cellular differentiation and proliferation, as well as during postnatal development and *in vitro* cell culture.³⁷ Collagen VIII is suggested to be partially responsible for the correct assembly of Descemet's membrane to ensure corneal stability.³⁸

Endothelial cells contain numerous mitochondria and the Golgi complex, indicating that they are metabolically

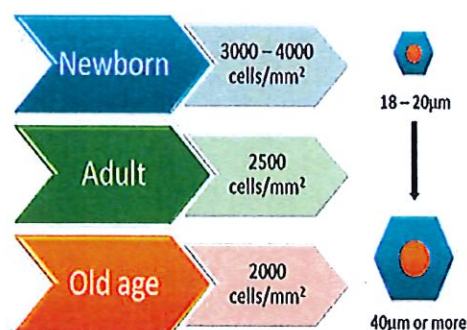


Figure 3 Changes in corneal endothelial cell density and size throughout life.

active and secretory.³⁹ This is related to the Na⁺/K⁺-ATP pump and Descemet's membrane secretion, respectively. The former is a major function of the corneal endothelium and is driven by ionic gradients located in the basolateral side of the membrane.³ An osmotic gradient of sodium is present between the aqueous humor and the stroma and results in the influx of sodium ions from the aqueous humor and in an efflux of potassium ions in the opposite direction. Carbon dioxide also diffuses into the cytoplasm of the endothelial cells and in combination with water, bicarbonate ions are produced in a reaction catalyzed by carbonic anhydrase. The bicarbonate ions then diffuse or are transported into the aqueous humor. Coupled with the movement of bicarbonate ions there is an efflux of water across the endothelial cells into the aqueous humor.² As a result of this activity, the stroma maintains a water content of ~78%.⁴⁰

A characteristic of the neural crest origin of the corneal endothelial cells is the expression of neuron-specific enolase (NSE).⁴¹ Although NSE is found in several tissues like smooth muscle cells, heart, and kidney, it can be used as a diagnostic tool for the identification of this cell type. A new monoclonal antibody has been generated (9.3.E) as a specific marker for human corneal endothelial cells (HCECs) that recognizes a protein mainly accumulated in the cell membrane and is useful for differentiating corneal endothelial cells from other cell types, especially corneal keratocytes.⁴²

HCECs do not have a significant capacity for *in vivo* regeneration, thus making them unable to replace dead or damaged cells.^{30,43} This occurs because HCECs are arrested in the G1-phase of the cell cycle. Three mechanisms have been identified that contribute to this: (1) cell-cell contact-dependent inhibition, (2) lack of effective growth factor stimulation, and (3) TGF- β 2 suppression of S-phase.

To maintain proper structure and function, endothelial cells respond to minor damage with stretching and centripetal migration into the injured area;⁴⁴ however, an increase in cell size (polymegathism) and variation in cell shape (pleomorphism) correlates to the reduced ability of the cells to hydrate the cornea.^{45,46} Endothelial cell density can be significantly decreased as a result of trauma, refractive surgery, previous penetrating, or endothelial keratoplasty or stress caused by disorders such as diabetes, glaucoma, or endothelial dystrophies.⁴⁷⁻⁴⁹ When endothelial cell density decreases significantly, from the average of 3000 to nearly 1000 cells/mm² (as in Fuchs' dystrophy) their function is compromised, corneal transparency is lost and surgery is required.⁵⁰

There are promising therapies for corneal endothelium repair and wound healing, including the arrest of cell

loss, endothelial cell transplantation, and stimulation of fluid secretion by the remaining endothelial cells.^{3,51} Nevertheless, keratoplasty remains the main treatment to repair this layer.^{48,50} The complications associated with this make the treatment of endotheliopathies a challenge for current and future research.

Clinical conditions of corneal endothelium and current treatments

Corneal blindness represents the fourth leading cause of blindness worldwide (5.1%) and is a major cause of visual impairment after cataracts, glaucoma, and age-related macular degeneration.⁵² Ocular trauma and corneal ulceration are also major causes of corneal blindness^{53,54} and may result in 1.5–2.0 million new cases of monocular blindness every year.⁵⁵ Given the difficulty of treating corneal blindness, public health prevention programs are the most effective options in terms of cost to reduce the number of cases worldwide. In fact, the main current treatment is keratoplasty; however, the access to this surgery is very difficult owing to lack of donors.^{56,57}

Corneal endothelial diseases that require corneal transplant include: Fuchs' dystrophy, bullous pseudophakic keratopathy, posterior polymorphous dystrophy, congenital hereditary endothelial dystrophy, iridocorneal endothelial syndrome, and some intermediate forms. The use of contact lenses and the effects of surgical procedures can also affect the endothelial tissue to a lesser extent.^{48,58-60} Fuchs' dystrophy affects ~4% of the population over 40 years. It is the major indication for penetrating keratoplasty in the United States, which accounts for 10–25% of all corneal transplants of different types. This is a significant number considering that the annual number of corneal transplants in the United States is more than 32 000.⁶¹ This disease is characterized by the presence of deposits on and thickening of Descemet's membrane, as well as changes in the shape, and size of the endothelial cells. The cornea progressively and slowly becomes opaque, causing blurred vision.⁶²

Although penetrating keratoplasty has been the standard procedure for most diseases of the cornea, the outcomes are not usually expected due to several factors, including the risk of immune-mediated graft rejection, and a significant increase in the prevalence of glaucoma following transplantation, as concluded by Allouch *et al*⁶³ and Valdez-García *et al*.⁶⁴ Therefore, an ideal strategy would be to replace only the damaged layer.

In the last several years there have been breakthroughs in the field of corneal endothelial transplantation, such as the development of endothelial keratoplasty and Descemet's stripping endothelial keratoplasty (DSAEK)

techniques. In 2005, only 4.5% of the donor corneas were used for endothelial keratoplasty. By 2007, this number increased to 50%.⁵¹ Nevertheless, the main problem with endothelial keratoplasty is a postoperative cell loss comparable to or higher than that observed with penetrating keratoplasty.⁶⁵ It has been documented that endothelial cell density decreases ~49% 24 months post-surgery and that cell loss can be higher in patients with previous glaucoma surgery. Neither donor age nor initial cell density proved to have significant influence on endothelial cell loss. The most promising strategy by which postoperative cell loss can be reduced effectively is the strict and adequate lowering of intraocular pressure.⁶⁶ Techniques such as Descemet's membrane endothelial keratoplasty and Descemet's membrane automated endothelial keratoplasty were developed, offering better visual results, with less scarring and less optical stromal aberrations. These procedures opened the possibility to replace the corneal endothelium with endothelium reconstructed by bioengineering.⁶⁷ However, clinically available procedures with artificial corneas have limitations such as inflammation of the retroprosthetic membrane and development of glaucoma, and are reserved for high-risk patients.^{68,69}

The limited availability of donor corneas and the current issues in surgical procedures require the development of new methods in the field of tissue engineering in order to improve corneal endothelial cell survival and increase corneal endothelial cell density. The emergent strategies in the field of cell biology and tissue cultivation of corneal endothelial cells aim at the production of transplantable endothelial cell sheets.

Cell therapy

Currently, cell therapy is aimed at reducing the problem of the lack of donor tissue. To repair the corneal endothelium, cell therapy focuses on the culture of corneal endothelial cells retrieved from the donor, in the donor's cornea, followed by transplantation into the recipient. Recent reports have demonstrated that corneal endothelial cells possess the ability to undergo mitosis in culture using these methods. HCEC *ex vivo* models are able to overcome the G1-phase and complete the cell cycle; this occurs after the release of cell-cell junctions and in the presence of appropriate growth factors. In fact, it has been proven that endothelial cells from both central and peripheral areas of the cornea proliferate *in vitro*⁷⁰ and that they can be cultured from young and adult donors, obtaining similar numbers of cells when specific growth factors are used.⁷¹

To successfully engineer human corneal endothelium from a small number of cells, the processes of isolation, preservation and expansion are critical. Recently,

research has focused on overcoming the challenge of harvesting HCECs. It is known that the main factors that influence the mitotic capacity of HCECs *in vitro* are: the method of culture, the nature of the growth factors contained in the medium, and the viability of the donor cornea. The latter is influenced by age, cell density, donor death-to-preservation time, preservation period, overall health of the donor, and the specific cause of death.⁷² The common methodology to isolate endothelial cells involves: (1) the retrieval of the corneal endothelium, (2) dissociation of cell junctions in paired Descemet's membrane/endothelial layer, and (3) culture in proper media. Based on the method used to dissociate the cell junctions, the procedures have been classified as enzymatic and non-enzymatic. The first is based on the use of enzymes such as collagenase, trypsin, or dispase.^{73,74} This technique has the tendency of leading to cellular degradation due to the incubation time required to detach cells from the matrix, and because it also allows for the dissociation of the collagen matrix in which the keratocytes are located. Additionally, it often results in contamination from the stromal cells. To overcome this problem, magnetic cell separation improves HCECs yield, allowing for a high separation efficacy.⁷⁵ The non-enzymatic method is based on the use of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to release cell-cell junctions at the same time as it promotes cell division upon exposure to mitogens.^{30,70,72,76} In this process, EDTA can also cause cell damage and decrease cell yield.⁷⁷ There is a combined method that uses collagenase II to generate preservable HCEC aggregates and a brief treatment with trypsin/EDTA leading to a high proliferation rate with less cell damage.⁷⁸

The addition of several different growth factors in the culture media has been used to promote HCEC expansion. The use of insulin and basic fibroblastic growth factor (bFGF) have been shown to promote mitosis in cells from peripheral cornea but not in the central zone.⁷⁹ In another study, nerve growth factor (NGF) along with bovine pituitary extract and epidermal growth factor (EGF) supported the expansion of cells from both central and peripheral areas of the cornea.⁷² In addition, a recent study concluded that a culture media that combines EGF, insulin, transferrin, bFGF, NGF, and pituitary extract promotes proliferative capacity up to the third passage.⁷³

In order to replicate the monolayer of the corneal endothelium, there have been developments to maintain cell morphology, density, and function. Materials like collagen, amniotic membrane, and biodegradable polymers have successfully been used in culture media and animal models.⁸⁰⁻⁸² Porcine corneal matrix and Descemet's membrane have also been used as scaffolds

for transplanted cells allowing good transparency in cat and rat corneas, and maintaining cell properties after the transplant.^{60,83} Human decellularized stromas have been used to culture HCECs, allowing them to retain the expression of Na^+/K^+ -ATPase and ZO-1 markers for greater than 14 days.⁸⁴ Hydrogel lens have also proved to be useful as a carrier device to transplant corneal endothelial cells in rabbits, maintaining graft clarity without signs of rejection and inflammation.⁸⁵ An additional method consists of the use of superparamagnetic microspheres incorporated into HCECs before transplantation and their alienation after the transplant toward a magnetic field source. This method has allowed cell attachment to corneal stroma without affecting cell viability or light transmittance in an *ex vivo* model.⁸⁶ Major advances have been reached in this field; however, efforts in developing new scaffolds are still focused on achieving full clarity of the cornea after transplantation, optimizing the number of steps needed for their production, and the generation of new biomembranes to be used in surgical procedures.

As an alternative to cultured HCECs, the use of corneal endothelial precursors from the peripheral cornea has demonstrated to be effective. Corneal endothelial stem cells are found as a sequestered niche at the junctional region between corneal endothelium and the trabecular meshwork, and are suggested to be a cell supply activated during wound healing.⁸⁷ For their isolation, a sphere-forming assay method is developed, in which the cells obtained from the corneal endothelium-Descemet's membrane complex are cultured under floating conditions and generate proliferating spheres, that produce neuronal and mesenchymal cell proteins.^{88,89} These corneal precursor spheres have been tested in an animal model of bullous keratopathy, without the use of a biocompatible carrier; they are injected directly into the anterior chamber and by placing the eye in downgaze enables their attachment to Descemet's membrane and corneal clarity can be achieved.^{90,91}

The production of corneal endothelial grafts from the same patient by culturing HCECs, or their precursors represents a valuable tool for reducing the risk of rejection in allogeneic transplants. However, the therapeutic use of stem cells in the cornea still requires an intact corneal stem cell compartment, which contradicts the main indication for the transplant. Furthermore, the amount of stem cells found in these compartments is very low and may require prolonged *ex vivo* culture to generate enough cells for a successful transplant.⁹² Therefore, further research is needed to find an alternative tissue source for corneal endothelial reconstruction, such as cells of extra-ocular origin.

Potential of using adult stem cells in the regeneration of corneal endothelium

Adult stem cells, especially those found in adipose tissue, bone marrow, and those obtained from umbilical cord blood have been widely studied for the development of new therapies for degenerative diseases.⁹³ They have self-renewal and plasticity characteristics, plus they have an advantage over embryonic and fetal stem cells by being easy to obtain and culture. In addition, they do not face ethical problems, because it is feasible to obtain them from the same patient.⁹⁴

Stem cells obtained from bone marrow and adipose tissue can differentiate into different cell types including chondrocytes, osteocytes, myocytes, and neural cells; the latter have been successfully obtained and used in an animal model in our laboratory.⁹⁵

Both types of adult stem cells express very similar surface markers and genes;⁹⁶ however, the procedure required to obtain bone marrow stem cells (BMSCs) can be uncomfortable for the patient. The amount of BMSCs collected is often low and the proportion of stem cells compared with the total number of nucleated cells is very low (0.001–0.01%). Subcutaneous adipose tissue is more abundant and often waste product in liposuction cosmetic and therapeutic type.^{97,98} The ability of adult stem cells to secrete different types of molecules with anti-apoptotic, immunomodulatory, angiogenic, chemoattractant, and anti-scarring properties provides the basis for their use in regenerative medicine.⁹⁹ Investigative therapies have been used in clinical trials with some designed to treat autoimmune diseases, including multiple sclerosis, lupus erythematosus, and Crohn's disease, as well as diabetes mellitus, myocardial infarction, different types of cancer, neurological disorders, and ocular surface diseases.⁹³

Several animal model reports support the use of adult stem cells as therapy for corneal diseases. In a study made using *Lum^{-/-}* mice (homozygous for disruptions in the lumican gene that produces aberrant collagen fibrils in the cornea), the intrastromal corneal injection of stem cells from umbilical cord blood was followed for 3 months post treatment. The corneal transparency returned after 12 weeks with an increase of about 10% in stromal thickness, which was recorded after 8 weeks with no immune rejection.¹⁰⁰ In another study, a rabbit model for limbal stem cell deficiency was used to transplant bone marrow stem cells suspended in fibrin gel.¹⁰¹ After 28 days, the corneas were completely epithelialized and transplanted stem cells expressed cytokeratin 3, a protein expressed by corneal epithelial cells. They had secondary reactions like neovascularization, corneal opacification, and inflammation. However, these are short-term results and

overall, the study provides evidence that bone marrow stem cells can be used for the treatment of corneal disorders. As an alternative, differentiated adult stem cells into corneal endothelial cells have demonstrated efficacy in the corneal clarity restoration in animal models. In our experience, differentiated cells are more likely to promote healing processes as compared with the effect of only adult stem cells (unpublished data). In 2010, Du *et al*¹⁰² demonstrated that stem cells isolated from human adipose tissue can differentiate into corneal keratocytes. After 3 weeks in pellet culture with enriched medium, stem cells adopted the keratocyte phenotype and expressed keratocan and keratan sulfate. In this study, the addition of bovine corneal extract to the culture medium did not enhance the levels of expressed keratocan, which suggest that differentiation relies more on the three dimensional culture environments than on molecular supplementation. A different study, demonstrated the ability of endothelial progenitor cells from bone marrow to differentiate into corneal endothelial cells.⁶⁰ In this experiment, the co-culture of corneal endothelial cells with endothelial bone marrow precursors for 10 days produced endothelial-like cells and the expression of AQP-1, tight junctions, and NSE. Moreover, differentiated cells were transplanted using porcine corneal acellular matrix as carrier into cat's corneas with stripped endothelium, returning corneal transparency after 28 days with little edema.

Recently, we reported a preliminary over-representation analysis of the main difference in the gene expression pattern between adipose mesenchymal stem cells and corneal endothelial cells to set a baseline for *in vitro* differentiation assays.¹⁰³ In this study, we identified 195 highly different expressed genes and their related pathways, protein interactions, growth factors, and biological processes. These data provide a valuable tool for designing a more appropriate induction media.

Among the animal models used for adult stem cell transplantation into corneal endothelium, White New Zealand rabbit has demonstrated to be advantageous given its resemblance with human corneal endothelium. In a previous study, we demonstrated that rabbits older than 6 months possess limited replicative ability to restore corneal endothelium, making it a suitable model of the human cornea in endothelial wound healing studies.¹⁰⁴

In order to be used as therapy for the regeneration of the corneal endothelium, bioengineered tissue needs to overcome the limits of obtaining functional cells in enough quantities for transplantation, development of better techniques of tissue engineering to grow an *ex vivo* endothelial cell sheet, and improve the mechanisms to slow the loss of endothelial cells following transplantation. Current results represent important

progresses in the development of new strategies based on alternative sources of tissue for the treatment of corneal endotheliopathies.

Conclusion

The lack of donor tissue for corneal transplants makes endothelium regeneration a challenge for researchers. The recently discovered ability of corneal endothelial cells to proliferate *in vitro* has opened the possibility of regenerating the corneal endothelium through bioengineering.

Currently, research is aimed at identifying optimal conditions for the isolation and culture of corneal endothelial cells and the optimal biomaterials use as scaffolds in transplantation. Differentiation assays should be supported by generic expression studies in order to ensure specific cell functionality. The advances of animal models show promising results, allowing for recovery of cornea transparency almost entirely.

Moreover, mesenchymal stem cells obtained from umbilical cord blood and bone marrow have shown an ability to regenerate the endothelium in animal models. Recently, it was demonstrated that in adipose tissue stem cells are found in quantities greater than those found in bone marrow, providing a more accessible source of cells. Furthermore, the discovery of progenitor cells in the periphery of the cornea has also shown potential for their use in healing the endothelium. Thus, bioengineered corneal endothelium using cells from the same patient represent a potential new treatment to restore visual acuity in patients with critical reduced endothelial corneal density. This new treatment would eliminate the main problems of corneal transplantation: lack of donors, the possibility of immune reaction after the surgery, and post-surgical complications such as infection and development of glaucoma.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37(3): 588–598.
- 2 Krachmer H, Manis J, Holland J. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. 2nd edn. Elsevier Mosby: Beijing, China, 2005.
- 3 Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22(1): 69–94.
- 4 Joyce NC, Harris DL, Melto DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(7): 2152–2159.

- 5 Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86(1): 279–367.
- 6 Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4(Pt 3): 389–424.
- 7 Graw J. Eye development. In: Koopman Peter (ed). *Current Topics in Developmental Biology* Vol. 90. Academic Press: San Diego, CA, USA, 2010, pp 343–386.
- 8 Fargo A, McDermott L, Soong K. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M, Jay Duker (eds). *Ophthalmology*. 3rd edn. Mosby Elsevier: China, 2004, pp 203.
- 9 Bennett JL, Zeiler SR, Jones KR. Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(12): 2996–3005.
- 10 Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev Biol* 2003; 255(2): 303–312.
- 11 Chen J, Wong-Chong J, SundarRaj N. FGF-2- and TGF- β 1-induced downregulation of lumican and keratocan in activated corneal keratocytes by JNK signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(12): 8957–8964.
- 12 Lee JG, Kay EP. NF-KB is the transcription factor for FGF-2 that causes endothelial mesenchymal transformation in cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(3): 1530–1538.
- 13 Lang RA. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol* 2004; 48(8-9): 783–791.
- 14 Liu W, Lagutin OV, Mende M, Strelt A, Oliver G. Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *EMBO J* 2006; 25(22): 5383–5395.
- 15 Gotoh N, Laks S, Nakashima M, Lax I, Schlessinger J. FRS2 family docking proteins with overlapping roles in activation of MAP kinase have distinct spatio-temporal patterns of expression of their transcripts. *FEBS Lett* 2004; 564(1-2): 14–18.
- 16 Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, Dudley A, Robertson E, Maas R. BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 1999; 207(1): 176–188.
- 17 Ittner LM, Wurdak H, Schwerdtfeger K, Kunz T, Ille E, Leveen P et al. Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF β signaling in neural-crest stem cells. *J Biol* 2005; 4(3): 1.
- 18 Nelms B, Labosky P. *Transcriptional Control of Neural Crest Development*. Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael, CA, USA, 2010.
- 19 Cvekl A, Tamn ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays* 2004; 26(4): 374–386.
- 20 Matt N, Ghyselinck NB, Pellerin I, Dupé V. Impairing retinoic acid signalling in the neural crest cells is sufficient to alter entire eye morphogenesis. *Dev Biol* 2008; 320(1): 140–148.
- 21 Gage PJ, Zacharias AL. Signaling "cross-talk" is integrated by transcription factors in the development of the anterior segment in the eye. *Dev Dyn* 2009; 238(9): 2149–2162.
- 22 Grocott T, Johnson S, Bailey AP. Neural crest cells organize the eye via TGF- β and canonical Wnt signalling. *Nat Commun* 2011; 2: 265.
- 23 Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010; 91(3): 326–335.
- 24 Whitekhardt D. Corneal endothelium: Overview. In: Darit DarleneA (eds). *Encyclopedia of the eye*. Academic Press: Oxford, UK, 2010, pp 424–434.
- 25 Matt N, Dupé V, Garnier JM, Demefeld C, Chambon P, Mark M et al. Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 2005; 132(21): 4789–4800.
- 26 Graue-Weichers L, Valdez-García J, Ramírez-Luquín T, Claros A. Densidad celular endotelial. Estudio en población general de la Ciudad de México. *Rev Mex Oftalmol* 1989; 63(3): 91–95.
- 27 Wörner CH, Olgún A, Ruiz-García JL, Garzón-Jiménez N. Cell pattern in adult human corneal endothelium. *PLoS One* 2011; 6(5): e19483.
- 28 Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3): 779–782.
- 29 Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4(6): 671–678.
- 30 Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2012; 95(1): 16–23.
- 31 Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972; 221(1): 43–54.
- 32 Fischberg J, Maurice DM. An update on corneal hydration control. *Exp Eye Res* 2004; 78(3): 537–541.
- 33 Srinivas SP. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci* 2010; 87(4): E239–E254.
- 34 Hamann S, Zeutlén T, La Cour M, Nagelhus N, Oitersen O, Agre P et al. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. *Am J Physiol* 1998; 274(5 pt 1): C1332–C1345.
- 35 Verkman AS. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res* 2003; 76(2): 137–143.
- 36 Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001; 10(21): 2415–2423.
- 37 Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell K, Durbecc J, Ghohestani R et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(11): 4989–4999.
- 38 Puk O, Dalke C, Calzada-Wack J, Ahmad N, Klawns M, Wagner S et al. Reduced corneal thickness and enlarged anterior chamber in a novel ColVIIIa2G257D mutant mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(12): 5653–5661.
- 39 Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89(6): 531–590.
- 40 Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 1985; 92(6): 759–763.
- 41 Böhne M, Vogelberg K, Engelmann K. Detection of neurone-specific enolase in long-term cultures of human corneal endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236(7): 522–526.
- 42 Engelmann K, Beduvarz J, Schäfer HJ, Friedl P. Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2001; 73(1): 9–16.
- 43 Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada N et al. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One* 2012; 7(1): e29677.

- 44 Sheng H, Bullimore MA. Factors affecting corneal endothelial morphology. *Cornea* 2007; 26(5): 520–525.
- 45 Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(8): 1542–1554.
- 46 Corkidi G, Marquez J, Usisima R, Toledo R, Valdez J, Graue E. Automated *in vivo* and online morphometry of human corneal endothelium. *Med Biol Eng Comput* 1993; 31: 432–437.
- 47 Inoue K, Kato S, Inoue Y, Amano S, Oshika T. The corneal endothelium and thickness in type II diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol* 2002; 46(1): 65–69.
- 48 Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 2003; 17(8): 912–918.
- 49 Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraiishi A, Joko T et al. Role of insulin in regulation of Na⁺-/K⁺-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(8): 3935–3942.
- 50 Eghrari AO, Gottsch JD. Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010; 5(2): 147–159.
- 51 Rose L, Kelliker C, Jun AS. Endothelial keratoplasty: historical perspectives, current techniques, future directions. *Can J Ophthalmol*. 2009; 44(4): 401–405.
- 52 Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004; 82(11): 844–851.
- 53 Treviño E, Durán F, Valdez J. IOVS 1993, Vol 34, ARVO Abstract, Program 1176 1993.
- 54 Valdez J, Treviño E, Durán F. IOVS 1993, Vol 34, ARVO Abstract, Program 2037 1993.
- 55 Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001; 79(3): 214–221.
- 56 Vajpayee RB, Sharma N, Jhanji V, Titiyal JS, Tandon R. One donor cornea for 3 recipients: a new concept for corneal transplantation surgery. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(4): 552–554.
- 57 Lawlor M, Kerridge I. Anything but the eyes: culture, identity, and the selective refusal of corneal donation. *Transplantation* 2011; 92(11): 1188–1190.
- 58 Valdez-García JE, Pauli A, Madrid-Valero G, Graue-Weichers E. Análisis morfométrico automatizado del ojo contralateral en queratopatía bulosa pseudofáquica. *Rev Mex Oftalmol* 2000; 74(6): 267–270.
- 59 Valdez-García JE, Graue-Weichers E, Márquez L, Rodríguez-Valdés C. Hallazgos morfométricos endoteliales en cirugía de catarata. Estudio comparativo extracapsular vs. intracapsular. *Rev Mex Oftalmol* 2000; 74(4): 169–172.
- 60 Shao C, Fu Y, Lu W, Fan X. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs* 2011; 193(4): 253–263.
- 61 Klintworth GK. Corneal dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 7.
- 62 Biswell R. Cornea. In: Riordan-Eva P, John P (eds). *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology*. McGraw Hill: USA, 2004, pp 1–29.
- 63 Allouch C, Borderie V, Touzeau O, Scheer S, Nordmann J, Laroche L. Incidence and factors influencing glaucoma after penetrating keratoplasty. *J Fr Ophthalmol* 2003; 26(6): 553–561.
- 64 Valdez-García JE, Morales-Lozano J, González-González A, Madero-Frech A, Quintanilla-Dieck J. Resultados del trasplante de córnea en pacientes con queratopatía bulosa. *Rev Mex Oftalmol* 2005; 79(3): 242–244.
- 65 Engelmann K, Valtink M, Lindemann D, Nitschke M. Transplantation of corneal endothelium—chances and challenges. *Klin Monbl Augenheilkd* 2001; 228(8): 712–723.
- 66 Bertelmann E, Pleyer U, Rieck P. Risk factors for endothelial cell loss post-keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84(6): 766–770.
- 67 Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2011; 95(1): 68–75.
- 68 Duan D, Klenkler BJ, Sheardown H. Progress in the development of a corneal replacement: keratoprosthesis and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(1): 59–72.
- 69 Carlsson DJ, Li F, Shimamura S, Griffith M. Bioengineered corneas: how close are we? *Curr Opin Ophthalmol* 2003; 14(4): 192–197.
- 70 Mimura T, Joyce NC. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(4): 1387–1396.
- 71 Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 2004; 23(8 Suppl): S8–S19.
- 72 Konomi K, Zhu C, Harris D, Joyce NC. Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4086–4091.
- 73 Peh GS, Toh KP, Wu FY, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One* 2011; 6(12): e28310.
- 74 Zhu C, Rawe I, Joyce NC. Differential protein expression in human corneal endothelial cells cultured from young and older donors. *Mol Vis* 2008; 14: 1805–1814.
- 75 Peh GS, Lee MX, Wu FY, Toh K, Balehosur D, Mehta JS. Optimization of human corneal endothelial cells for culture: the removal of corneal stromal fibroblast contamination using magnetic cell separation. *Int J Biomater* 2012; 12: 601302.
- 76 Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10): 2930–2935.
- 77 Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study. *Cornea* 2001; 20(7): 731–737.
- 78 Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(2): 614–620.
- 79 Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34(2): 149–153.
- 80 Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Hayashida Y, Chen S, He H et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(9): 2992–2997.
- 81 Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(3): 800–806.

- 82 Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, McLaughlin BJ. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng* 1999; 5(3): 187–196.
- 83 Schwartzkopf J, Bredow L, Mahlenbrey S, Boehringer D, Reinhard T. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. *Mol Vis* 2010; 16: 2368–2375.
- 84 Choi JS, Williams JK, Greven M, Walter KA, Laber PW, Khang G et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials* 2010; 31(26): 6738–6745.
- 85 Mohay J, Wood TO, McLaughlin BJ. Long-term evaluation of corneal endothelial cell transplantation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997; 95: 131–148.
- 86 Patel SV, Bachman LA, Hann CR, Baltler CK, Fautsch MP. Human corneal endothelial cell transplantation in a human ex vivo model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(5): 2123–2131.
- 87 Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis* 2005; 11: 816–824.
- 88 Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(5): 1626–1631.
- 89 Yamagami S, Mimura T, Yokoo S, Takato T, Amano S. Isolation of human corneal endothelial cell precursors and construction of cell sheets by precursors. *Cornea* 2006; 25: S90–S92.
- 90 Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(10): 3637–3644.
- 91 Mimura T, Yamagami S, Usui T, Seicht, Honda N, Amano S. Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial deficiency model. *Curr Eye Res* 2007; 32(7-8): 617–623.
- 92 De Miguel MP, Alio JL, Arnalich-Montiel E, Fuentes-Julian S, de Benito-Llopies L, Amparo F et al. Cornea and ocular surface treatment. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5(2): 195–204.
- 93 Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 9.
- 94 Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J Cell Physiol* 2009; 218(1): 9–12.
- 95 Martínez HR, Zavala-Arcos J, Moreno-Cuevas J, Gutiérrez-Alcalá J, González-Garza MT. XXXIV Reunión Anual de la Academia Mexicana de Neurología. *Rev Mex Neurosci* 2010; 11(5): 380–437.
- 96 Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi H, Suh K et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14(4-6): 311–324.
- 97 Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med* 2010; 8: 131.
- 98 Zuk PA. The adipose derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 2010; 21(11): 1783–1787.
- 99 Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 2009; 14: 4281–4298.
- 100 Liu H, Zhang J, Liu CY, Wang I, Sieber M, Chang J et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One* 2010; 5(5): e10707.
- 101 Gu S, Xing C, Han J, Tso MO, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 2009; 15: 99–107.
- 102 Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann M, Marra K, Rubin J et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Mol Vis* 2010; 16: 2680–2689.
- 103 Valdez J, Zavala J, Trevino V, Martinez E. IOVS 2012, ARVO E-Abstract, Program 6008, 2012.
- 104 Valdez JE, Oak SS, Laing RA. IOVS 1994, Vol 35, ARVO Abstract, Program 1604 1994.

DATA NOTE

Open Access



Primary explant culture and collagen I substrate enhances corneal endothelial cell morphology

Judith Zavala¹, María-Dolores Montalvo-Parra¹, Guillermo-Isaac Guerrero-Ramírez¹, Carlos-Alberto Rodríguez-Barrientos², Víctor Treviño¹ and Jorge E. Valdez-García^{1*}

Abstract

Objectives: Corneal endothelial cell (CEC) isolation and harvest aim to produce engineered grafts to solve donor corneal tissue shortage. To yield high amounts of CEC maintaining morphological and molecular characteristics, several isolation and culture conditions are reported. Here, we combined direct explant culture, with three different coating conditions and a two-step media approach to compare confluence efficiency, morphology, and specific molecular markers expression.

Data description: Confluence was reached after 2 weeks in the three coating conditions (Matrigel, collagen I, and in uncoated plates) using a two-step approach (proliferative medium without pituitary extract, followed by stabilizer basal medium). Na/K-ATPase and GPC4 markers were detected by immunocytochemistry while GPC4, CD200, and TJP1 by RT-PCR in the three CEC coating culture conditions. CEC in proliferative medium showed spindle morphology in the three conditions. Polygonal morphology was seen in CEC cultures using basal medium under uncoated and collagen I coated plates. CEC cultured in Matrigel-coated plates remained with spindle morphology in basal medium.

Keywords: Corneal endothelium, Primary cell culture, Collagen I

Objective

Corneal endothelial cell (CEC) isolation and harvest aim to produce engineered grafts to solve donor corneal tissue shortage. To yield high amounts of CEC maintaining morphological and molecular characteristics, several isolation and culture conditions are reported. Isolation by enzymatic digestion using collagenase, dispase, and trypsin-EDTA yields high proliferation rates. However, this treatment can decrease the viability of CEC obtained [1–3]. Culture conditions comprise the use of substrate coated plates and media with different supplementation, including growth factors such as epidermal (EGF), basic fibroblastic (FGFb), neural (NGF), and insulin growth factor (IGF), along with pituitary extract (PE), CaCl₂, and ascorbic acid among others, which provides different

outcomes in terms of morphology and specific molecular markers expression [3].

This work is focused on the generation of tissue grafts for future corneal endothelium engineering [4–9]. Preliminary results showed that CEC can proliferate when isolated by enzymatic digestion and using a previously reported supplemented medium containing PE [5, 6, 9]. However, isolation by enzymatic digestion yielded low amounts of viable cells (data not available). In addition, the use of PE and FBS generates uncertainty about the components needed for the control of cell identity and proliferation. To set the best conditions for isolation and harvesting of CEC of rabbits for tissue engineering purposes, we tested the removal of enzymatic digestion using direct explant culture, the two-step media approach that uses a proliferative media without PE, and three different coating conditions (Matrigel, collagen I and no coated plate). We compared the outcomes in

*Correspondence: jorge.valdez@itesm.mx

¹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Ave. Morones Prieto # 3000, 64710 Monterrey, NL, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

terms of confluence efficiency, morphology, and specific molecular markers expression.

Data description

Materials and methods

Six White New Zealand rabbits 3-month-old were sacrificed under general anesthesia with and a lethal intracardiac injection of sodic pentobarbital. A corneoscleral rim excision was made and the conjunctiva was dissected. Lens and aqueous humor were removed and the corneas were obtained. Under sterile conditions, Descemet's membrane were separated from corneal stroma and rinsed with basal stabilizer medium (SM) containing OptiMEM-I 8% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics. Corneal endothelia were peeled off from the Descemet's membrane and a ~ 5 mm² section was cultured in proliferative medium (PM) containing OptiMEM-I 8% FBS, 20 ng/mL of nerve growth factor (NGF), 5 ng/mL of epidermal growth factor (EGF), 200 µg/L of calcium chloride, 20 µg/mL of ascorbic acid, 0.08% chondroitin sulfate, and antibiotics over Matrigel, collagen I or no coated plate until confluence (~ 90% of the plate showed adherent cells, ~ 15 days). The plates were tripzinised and cultured in SM. Morphological changes were photodocumented. RNA was isolated from CEC cultured in PM and SM. Final point RT-PCRs were made to analyze the expression of the specific CECs markers: glypican-4 (GPC4), tight junction protein 1 (TJP1), and CD200; housekeeping gene glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used. Electrophoresis of PCR products was performed on a 2% agarose gel and the bands were photodocumented. Immunocytochemistry was performed to analyze the presence of GPC4 (Abcam, ab150517, Cambridge, UK) and Na/K-ATPase (Abcam, ab176163, Cambridge, UK) in CEC cultured in each condition. Images were obtained with a fluorescence inverted microscope. Detailed description of experimental procedures (rabbit euthanasia, corneal dissection, RNA isolation, RT-PCR parameters, and immunocytochemistry) along with manufacturer information

of reagents, equipment, and software is provided in the data repository.

Results

The figure in data file 1 (located in Figshare: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771484.v1>) shows representative results of the morphological changes of CEC cultures. CEC cultured for 7 days in PM over Matrigel, collagen I and uncoated plates showed spindle morphology. After medium was replaced using SM, characteristic polygonal morphology of CEC was clearly observed after 48 h in collagen I and uncoated plates. CEC in Matrigel remained with spindle morphology. After cultivation in SM over Matrigel, collagen I, and uncoated plates, CEC expressed GPC4 and Na/K-ATPase. Positive immunocytochemistry results of GPC4 in CEC cultured in collagen I and uncoated plates and Na/K-ATPase in CEC cultured in Matrigel are shown (data file 2, located in Figshare: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771496>). CEC cultured with PM over Matrigel and uncoated plates, and CEC cultured in SM over collagen I, Matrigel, and uncoated plates expressed GPC4, CD200, TJP1, and GAPDH (data file 3, located in Figshare: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5615449.v9>).

In summary, PM (with no pituitary extract) followed by a SM over uncoated and collagen I coated plates promotes CEC proliferation from primary explant, polygonal shape acquisition and the expression of canonical markers of CEC. Matrigel coated plates also promoted CEC proliferation and expression of canonical markers, but failed to allow the acquisition of polygonal shape, which is essential for CEC to be used for corneal engineering purposes.

Limitations

This experiment aimed to provide evidence of the advantage of isolating corneal endothelial cells from direct explant culture using a two-step approach over collagen I and uncoated plates. Shortcomings that prevented the data to be used as part of a full research paper were:

Table 1 Overview of data files/data sets

Label	Name of data file/data set	File types (file extension)	Data repository and identifier (DOI or accession number)	License
Data file 1	Morphological changes of corneal endothelial cells cultured in proliferative and stabilizer media over collagen I, Matrigel and uncoated plates	TIF	Figshare (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771484.v1)	CC-BY 4.0
Data file 2	Immunocytochemistry of GPC4 and ATPase in corneal endothelial cells cultured in stabilizer medium over collagen I, Matrigel and uncoated plates	TIF	Figshare (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771496)	CC-BY 4.0
Data file 3	RT-PCR results for the expression of GPC4, CD200, TJP1, and GAPDH in corneal endothelial cells cultured in stabilizer and proliferative media over collagen I, Matrigel and uncoated plates	TIF	Figshare (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5615449.v9)	CC-BY 4.0

- Data collection of immunocytochemistry was not possible for all treatments, given the small amount of CEC obtained for each preparation.
- Data collection of CEC markers expression for RT-PCR in cells cultured in collagen I with proliferative medium was not possible given the small amount of RNA obtained.
- It was not possible to obtain fresh rabbit corneas to repeat the experiments.

Abbreviations

CEC: corneal endothelial cells; GPC4: glypican 4; TJP1: tight junction protein 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Authors' contributions

JZ designed, carried out isolation and culture of cells and immunocytochemistry and acquired part of the data. MDMP and GiGR carried out RNA isolation, RT-PCR, and analyzed immunocytochemistry data. CARB made substantial contributions to the conception and design of the experiment. VT and JEVG revised the manuscript and provided final approval of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Ave. Morones Prieto # 3000, 64710 Monterrey, NL, Mexico. ² Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Av. Doctores Fernández Vega # 34, 33012 Oviedo, Asturias, Spain.

Acknowledgements

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The data described in this data note can be freely and openly accessed on Figshare. Please see Table 1 and reference list for details and links to the data.

Consent for publication

Not applicable.

Data citations

1. Zavala, J. Figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771484.v1> (2018).
2. Zavala, J. Figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5771496> (2018).
3. Zavala, J. Figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5615449.v9> (2018).

Ethics approval and consent to participate

All procedures were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals, Tecnológico de Monterrey, Mexico (Protocol # Re-2016-015).

Funding

This work was funded by endowments from Tecnológico de Monterrey.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 8 December 2017 Accepted: 12 January 2018

Published online: 18 January 2018

References

1. Joyce N. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2012;95:16–23.
2. Mimura T, Joyce N. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:1387–96.
3. Peh G, Toh K, Wu F, Tan D, Mehta J. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS ONE.* 2011;6:e28310.
4. Zavala J, Lopez Jaime GR, Rodriguez Barrientos CA, Valdez-García JE. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond).* 2013;27:579–88.
5. Zavala J, Rodriguez-Barrientos CA, Valdez JE. Morphological profile analysis of cultured corneal endothelial cells in Mitogenic/Resting culture system for applications in tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:5189.
6. Rodriguez-Barrientos CA, Kunzevitzky NJ, Bartakova A, Zavala J, Goldberg JL, Valdez JE. Optimization of human corneal endothelial cell morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1146.
7. Valdez-García JE, Mendoza G, Zavala J, Zavala-Pompa A, Brito G, Cortés-Ramírez JA, Elisseff J. In vivo biocompatibility of chitosan and collagen-vitrigel membranes for corneal scaffolding: a comparative analysis. *Curr Tissue Eng.* 2016;5:123–9.
8. Valdez-García JE, Lozano-Ramírez JF, Zavala J. Adult white New Zealand rabbit as suitable model for corneal endothelial engineering. *BMC Res Notes.* 2015;8:28.
9. Rodriguez-Barrientos CA, Zavala J, Treviño V, Aguirre R, Valdez JE. Gene expression profile analysis of cultured corneal endothelial cells in Mitogenic/Resting culture system for applications in tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:5187.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

